

Genregulatorische Netzwerke für die Adaptation von *Dinoroseobacter shibae* an Eisenmangel

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Maren Behringer
aus Neustadt a. Rbge.

1. Referentin oder Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn
2. Referentin oder Referent: Prof. Dr. Martin Bröring
eingereicht am: 30.01.2019
mündliche Prüfung (Disputation) am: 30.04.2019

Druckjahr 2019

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Maren Behringer, Elisabeth Härtig and Dieter Jahn

The RirA like transcriptional regulator of *Dinoroseobacter shibae* senses iron via a $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ cluster as cofactor. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 2018

Posterbeiträge

Maren Behringer, Dieter Jahn and Elisabeth Härtig

Biochemical characterization and functional analysis of the iron responsive regulator RirA from *Dinoroseobacter shibae*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 2016

Maren Behringer, Elisabeth Härtig and Dieter Jahn

Biochemical characterization of the iron responsive regulator RirA from *Dinoroseobacter shibae*. “Mechanisms of Gene Regulation” Meeting, VAAM Fachgruppe 2016

Maren Behringer, Elisabeth Härtig and Dieter Jahn

Identification of a $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ cofactor and functional analysis of the iron responsive regulator RirA from *Dinoroseobacter shibae*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 2017

Maren Behringer, Peter Schweyen, Dirk Baabe, Martin Bröring, Dieter Jahn and Elisabeth Härtig

Iron-sensing of the transcriptional regulator RirA of *Dinoroseobacter shibae*. Steenbock Symposium, Madison 2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das marine Habitat – Eisenlimitation im Meer.....	1
1.2 Die Gruppe der Roseobacter	2
1.3 Eisenaufnahmesysteme in Bakterien.....	5
1.4 Regulation der Eisenaufnahme in Bakterien	7
2. Zielsetzung	13
3. Material und Methoden.....	14
3.1 Geräte	14
3.2 Chemikalien.....	15
3.3 Kommerzielle Kits, Enzyme, Fertiglösungen und Oligonukleotide	16
3.4 Bakterienstämme und Plasmide	20
3.5 Mikrobiologische Techniken.....	27
3.5.1 Sterilisation	27
3.5.2 Bakterienkultivierung auf Agarplatten	27
3.5.3 Bakterienkultivierung in Flüssigkultur	28
3.5.4 Antibiotika	30
3.5.5 Anlegen von Glycerinkulturen.....	31
3.5.6 Bestimmung der Zelldichte.....	31
3.6 Molekularbiologische Techniken	32
3.6.1 Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (RbCl-Methode)	32
3.6.2 Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (CaCl ₂ -Methode)	32
3.6.3 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	33
3.6.4 Konjugaler Gentransfer von Plasmid-DNA in <i>D. shibae</i>	33
3.6.5 Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	34
3.6.6 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol – Extraktion und Ethanol Fällung.....	35
3.6.7 Präparation genomischer DNA aus <i>D. shibae</i>	35
3.6.8 DNA Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion	36
3.6.9 Multiplex PCR	37
3.6.10 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
3.6.11 Aufreinigung von DNA Fragmenten	39
3.6.12 Dephosphorylierung der DNA Enden.....	39

3.6.13 Ligation von DNA	39
3.6.14 Ligationsunabhängige Klonierung (Ligation independent cloning, LIC)	39
3.6.15 Ortsgerichtete Mutagenese	41
3.6.16 DNA-Gelelektrophorese	42
3.6.17 Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen	42
3.6.18 Konstruktion von Plasmiden zur Herstellung von Deletionsmutanten in <i>D. shibae</i>	43
3.6.19 Konstruktion von Plasmiden zur Komplementation.....	43
3.6.20 Konstruktion von Plasmiden zur Produktion von RirA und Mutanten in <i>E. coli</i>	44
3.6.21 Konstruktion von Plasmiden zur Produktion von IscR und Mutanten in <i>E. coli</i>	45
3.6.22 Herstellung von <i>D. shibae</i> Stämmen zum Test von Reportergenfusionen...	45
3.6.23 Anaerobisieren von Lösungen	47
3.6.24 RNA Präparation	47
3.6.25 Einfarben Microarray Analyse	49
3.6.26 RNA Sequenzierung	51
3.7 Biochemische Techniken	51
3.7.1 Heterologe Proteinproduktion und Reinigung von <i>D. shibae</i> RirA	51
3.7.2 Heterologe Proteinproduktion und Reinigung von <i>D. shibae</i> IscR	53
3.7.3 Regeneration von Strep-Tactin Säulenmaterial	54
3.7.4 Expressionstest von RirA	55
3.7.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
3.7.6 Westernblot (Semi Dry-Methode) mittels Strep-Antikörper	58
3.7.7 Hämin-Färbung (Heme stain)	59
3.7.8 Butanon Extraktion.....	61
3.7.9 Umpuffern des Proteins über eine NAP-Säule	62
3.7.10 Konzentrierung der Proteinlösung	62
3.7.11 Proteinkonzentrationsbestimmung	62
3.7.12 Eisenbestimmung nach Loevenberg	62
3.7.13 Eisenbestimmung mittels der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	63
3.7.14 Schwefelbestimmung.....	64
3.7.15 Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Clustern.....	65
3.7.16 UV/Vis Spektroskopie	65

3.7.17 ESR Messungen	66
3.7.18 Zugabe zwei-wertiger Ionen	67
3.7.19 Zyklische Voltammetrie	67
3.7.20 Mössbauer Analyse von Proteinen aus einem <i>E. coli</i> Gesamtzellextrakt.....	68
3.7.21 Herstellung einer ⁵⁷ Eisen-Citrat Lösung.....	68
3.7.22 Analytische Gelpermeationschromatographie (GPC)	69
3.7.23 Gelretardationsanalyse (EMSA, „Electrophoretic Mobility Shift Assay“) mit gereinigtem RirA und IscR aus <i>D. shibae</i>	70
3.7.24 DNaseI-Footprint mit gereinigtem RirA aus <i>D. shibae</i>	74
3.7.25 Kristallisationsexperimente mit dem Regulator RirA aus <i>D. shibae</i>	77
3.7.26 β -Galaktosidase Enzymtest.....	78
3.7.27 Aceton/Methanol Extraktion.....	79
4. Ergebnisse und Diskussion	80
4.1 <i>In vivo</i> Analyse der eisenabhängig regulierten Gene mittels Transkriptomanalysen	80
4.1.1 Eisenabhängige Regulatoren in <i>D. shibae</i>	88
4.2 Funktionelle <i>in vitro</i> Untersuchung des eisenabhängigen Regulators RirA aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>	91
4.2.1 Heterologe Produktion von <i>D. shibae</i> RirA.....	91
4.2.2 Affinitätschromatographische Reinigung des eisenabhängigen Regulators RirA aus <i>D. shibae</i>	94
4.2.3 Spektroskopische Untersuchung des eisenabhängigen Kofaktors.....	97
4.2.4 Biochemische Charakterisierung eines [3Fe-4S] ¹⁺ Clusters als Kofaktor.....	99
4.2.5 Zwei wertige Ionen können nicht als vierter Ligand im [3Fe-4S] ¹⁺ Cluster dienen.....	108
4.2.6 Quantitative Bestimmung des Eisen und Schwefelgehalts.....	110
4.2.7 Das [3Fe-4S] ¹⁺ Cluster wird durch drei Cystein Liganden koordiniert.....	111
4.2.8 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von RirA	114
4.3 DNA-Bindungsanalyse mit dem RirA Protein mittels Gelretardationsstudien...	116
4.3.1 Funktionelle DNA <i>in vitro</i> Bindestudien von RirA an ein 155 mer Promotorfragment mittels Gelretardationsanalyse	117
4.3.2 Analyse der Bindungsfähigkeit von RirA mittels DNaseI-Footprintanalysen	118
4.3.3 Analyse der Bindungsfähigkeit an ein verkürztes 41 mer <i>hemb2</i> Promotorfragment.....	120

4.4 Kristallisationsexperimente mit dem anaerob gereinigten RirA Protein aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>	123
4.5 Funktionelle <i>in vitro</i> Untersuchung des eisenabhängigen Regulators IscR aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>	126
4.5.1 Heterologe Produktion und Reinigung von IscR.....	126
4.5.2 Spektroskopische Analysen zur Identifikation des Kofaktors.....	128
4.5.3 Die Spezifität der Hämbindung	133
4.5.4 Identifikation potentieller Liganden für die Häm Bindung	137
4.5.5 Heterologe Produktion des IscR Proteins mit einem zusätzlichen Hämin Aufnahmesystem	140
4.5.6 Bindungsstudien mittels Gelretardationsanalysen	141
4.6 Rolle der identifizierten RirA und IscR Regulatoren für die Adaptation an Eisenmangel.....	145
4.7 Rolle der Regulatoren RirA und IscR bei der eisenabhängigen Genregulation..	157
4.7.1 Das RirA Regulon.....	157
4.7.2 Das IscR Regulon	162
4.7.3 Das Fur Regulon	167
4.7.4 Das Irr Regulon.....	177
4.7.5 Regulation des eisenabhängigen Genclusters in <i>D. shibae</i>	184
4.7.6 Eisenabhängiges Regulationsnetzwerk von <i>D. shibae</i>	205
5. Zusammenfassung.....	209
6. Summary	210
7. Ausblick.....	211
8. Literaturverzeichnis.....	212
9. Anhang	221
9.1 Abbildungsverzeichnis	228
9.2 Tabellenverzeichnis.....	233
10. Danksagung	235

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Å	Angström
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Aminoperoxodisulfat
bar	Einheit für Druck (Bar)
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat, 4-toluidine Salz
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Calf Intestine Phosphatase)
Cml	Chloramphenicol
Da	Dalton
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotide
ds	doppelsträngig
<i>D. shibae</i>	<i>Dinoroseobacter shibae</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EMSA	Gelretardationsanalyse “Electrophoretic Mobility Shift Assay”
EtOH	Ethanol

Fe	Eisen
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisen
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisen
Fe-S	Eisen-Schwefel
Gm	Gentamicin
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Zeitangabe Stunde (<i>engl.</i> hour)
HABA	4-Hydroxyazobenzen-2-Carboxysäure
hMB	halbkonzentriertes Marine Broth
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LB	lysogeny Broth
log2 FC	Änderung der Genexpression logarithmiert zur Basis 2
LTTR	LysR-Typ-Transkriptionsregulatoren
M _r	relative molekulare Masse
mA	Milliampere
MB	Marine Broth
min	Zeitangabe in Minute
NAD ⁺	Nikotinamidadeninnukleotid (oxidiert)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NBT	Nitroblauttriazoliumchlorid
OD	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ [nm]
ONPG	2-Nitrophenol-β-D-Galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Perchlorsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>engl.</i> rounds per minutes)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Zeitangabe in Sekunden
ss	einzelsträngig (<i>engl.</i> single strand)
SV	Säulenvolumen
SWM	Salzwasser Medium
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-Aminoethansulfonat
U	Unit(s)
UV	Ultraviolettes Licht
Wt	Wildtyp
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (<i>engl.</i> volume per volume)
Vis	sichtbares Licht (<i>engl.</i> visible light)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>engl.</i> weight per volume)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
λ	Wellenlänge

1. Einleitung

1.1 Das marine Habitat – Eisenlimitation im Meer

Mehr als 71 % der Erdoberfläche ist mit Wasser bedeckt. Somit bieten Meere und Ozeane einen der vielfältigsten Lebensräume für Lebewesen. Die am häufigsten vorkommenden Nährstoffe im Meer sind Stickstoff, Phosphor und Silizium. Einige Spurenelemente wie Zink, Mangan, Kupfer oder Eisen sind weniger vorhanden, wobei Eisen eines der wichtigsten Spurenelemente im Meer ist (Sunda, 2012). Eisen ist das vierthäufigste Element der Erdkruste, dennoch liegt die Verfügbarkeit an löslichem Eisen im Meer unter 0,2 nM (Liu & Millero, 2002). Eisen gelangt durch Windverwehungen von terrigenem Material, durch Flüsse, durch Anlagerung von Sedimenten und den freiwerdenden Staubpartikeln aus schmelzendem Polareis in die Meere und Ozeane (Jickells *et al.*, 2005; Bergquist & Boyle, 2006; Buck *et al.*, 2007; Eldridge *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 1994).

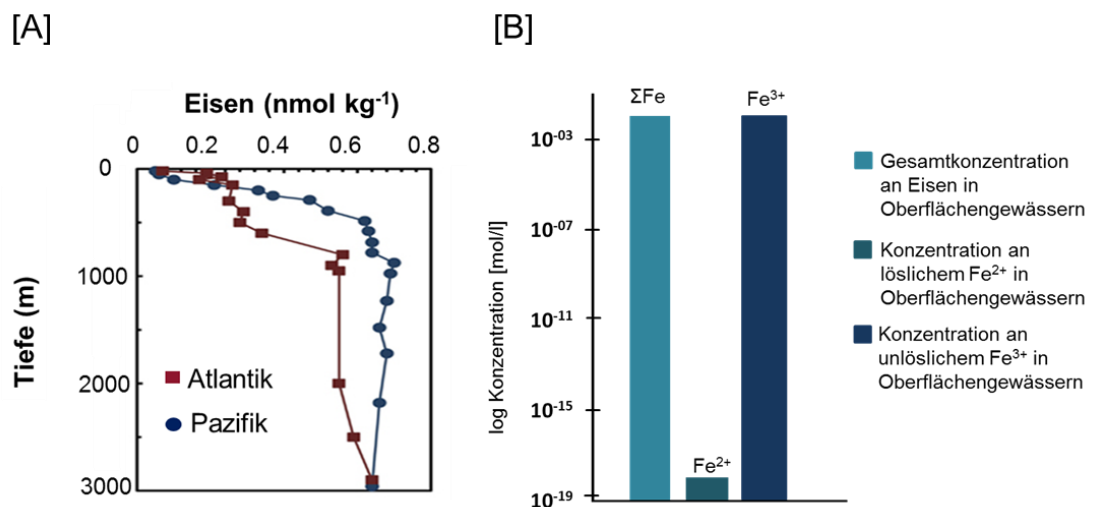


Abb. 1: Übersicht über die Eisenverfügbarkeit im Meer. A: Zunahme der Eisenverfügbarkeit mit zunehmender Meerestiefe sowohl im Atlantik (rot) als auch im Pazifik (blau) (modifiziert nach (Sunda, 2012)). B: Verteilung des Eisens in sauerstoffreichen Oberflächengewässern. Der Gesamtgehalt des Eisens beträgt ca. 10⁻¹ mol/l, davon ist mit 10⁻¹⁸ der Anteil an löslichem Eisen weniger als 0,18 % (modifiziert nach (Liu & Millero, 2002)).

In Oberflächengewässern mit einem hohen Sauerstoffanteil ist durch die Vielzahl an dort lebenden Mikroorganismen der Anteil an freiem Eisen stark limitiert. Wohingegen in tieferen Schichten des Meeres die Konzentration an freiem Eisen durch die Remineralisierung steigt (Abb. 1 A) (Boyd & Ellwood, 2010). Das verfügbare Eisen im Meer liegt in verschiedenen Formen vor. Den höchsten Anteil mit ca. 99 % macht die unlösliche Fe³⁺

Form des Eisens aus. Diese Form kann durch Siderophore gebunden und von Mikroorganismen aufgenommen werden. Eine weitere Alternative für die Aufnahme von Fe^{3+} ist die als Zentralatom im Häm gebundene Form. Häm kann von Mikroorganismen aufgenommen werden und als Eisenquelle dienen. Nur ca. 1 % des verfügbaren Eisens liegt in der löslichen Fe^{2+} Form vor (Abb. 1 B) (Gledhill & Buck, 2012). Den stärksten Einfluss hat die Verfügbarkeit von Eisen auf das Wachstum von Phytoplankton, diverser Algen Spezies und Bakterien. Eisen ist in Kofaktoren wie Häm und Eisen-Schwefel Clustern an vielen physiologischen Prozessen wie z. Bsp. der Energiegewinnung oder der Atmungskette beteiligt und daher essentiell. Außerdem spielt Eisen eine zentrale Rolle bei der Regulation des biologischen Kohlenstoff Zyklus im Meer, da Eisen am biologischen Transfer von Kohlenstoff in die Tiefsee, der sogenannten biologischen CO_2 Pumpe beteiligt ist. Studien haben gezeigt, dass diese CO_2 Pumpe durch die Verfügbarkeit von Eisen reguliert wird (Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, 2018). Dadurch hat die Verfügbarkeit von Eisen einen direkten Einfluss auf die Regulation des CO_2 Gehalts in der Atmosphäre (Sunda, 2012).

1.2 Die Gruppe der *Roseobacter*

Die zu den α -Proteobakterien gehörende Gruppe der *Roseobacter* machen ca. 25 % der marinen mikrobiellen Gemeinschaft aus. Mitglieder der *Roseobacter* zeichnen sich durch vielfältige Anpassungsmechanismen aus wie die Fähigkeit der aeroben anoxygenen Photosynthese oder die Oxidation von Kohlenstoffmonoxid unter Verwendung von Sauerstoff zu Kohlenstoffdioxid (Wagner-Döbler & Biebl, 2006). Außerdem sind sie in der Lage verschiedenen Habitats innerhalb ihrer marinen Umgebung zu besiedeln, wie Polargewässer, Algenblüten, marine Invertebraten, Sedimente oder sauerstoffreiche und küstennahe Oberflächengewässer (Abb. 2) (Wagner-Döbler & Biebl, 2006). Innerhalb ihres jeweiligen Habitats sind die Mikroorganismen diversen Schwankungen bezüglich Temperatur, Sauerstoffgehalt und Nährstoffen ausgesetzt. Einer dieser Mikronährstoffe ist das Eisen. Eisen wird für viele Enzyme und Proteine, die einen Eisen oder Häm abhängigen Kofaktor binden, benötigt, die unter anderem an der Atmung, der Nitrat Reduktion, der Photosynthese, oder der Nitrat Assimilation beteiligt sind. Häufige Kofaktoren sind Fe-S Cluster sowie Häm, die in vielen regulatorisch aktiven Proteinen benötigt werden und hierbei an Redoxprozessen beteiligt sind (Johnson *et al.*, 2005).

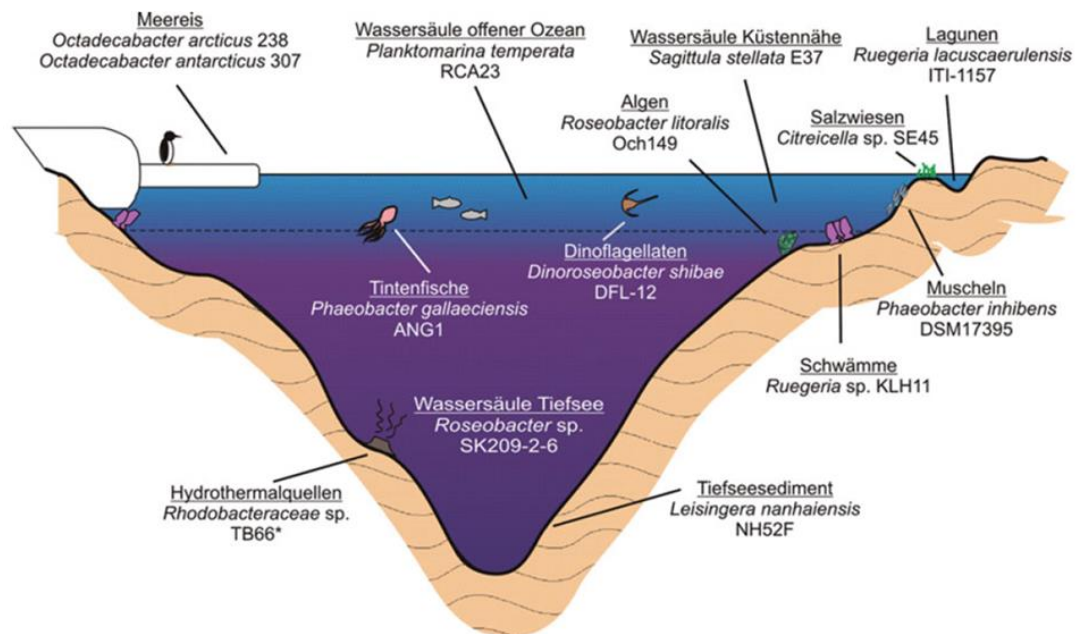


Abb. 2: Übersicht der Verteilung der einzelnen Mitglieder der Roseobacter Gruppe. Mitglieder der Roseobacter Gruppe können im Meereis, in der Wassersäule der offenen See und der Küstennahen Wassersäule, in Lagunen, Salzweiden, Hydrothermalquellen und im Tiefseesediment, sowie in Symbiose mit Algen, Muscheln und Schwämmen gefunden werden (Voget et al., 2014).

Für die Erforschung dieser physiologischen Anpassungsmöglichkeiten sowie der phylogenetischen Variabilität dieser Gattung ist es von Vorteil, dass einige kultivierbare Stämme der Roseobacter sich unter Laborbedingungen nur unwesentlich von Isolaten aus der Umwelt unterscheiden (Wagner-Döbler & Biebl, 2006). Einer dieser Stämme ist das auch in Symbiose mit Dinoflagellaten vorkommende Bakterium *Dinoroseobacter shibae* (Abb. 3 b). *D. shibae* wird als Modellorganismus für die Gruppe der Roseobacter untersucht.

D. shibae wurde nach dem Entdecker der marinen aeroben anoxygenen phototrophen Bakterien Professor Tsuneo Shiba benannt (Biebl et al., 2005). *D. shibae* ist ein Gram-negatives Bakterium und bildet Kokken oder ovoide Stäbchen und ist einseitig polar begeißelt. Das Bakterium ist in der Lage neben dem photosynthetisch aktiven Bakteriochlorophyll *a* auch das für die Pigmentierung verantwortliche Spheroidenon zu bilden (Abb. 3 c).

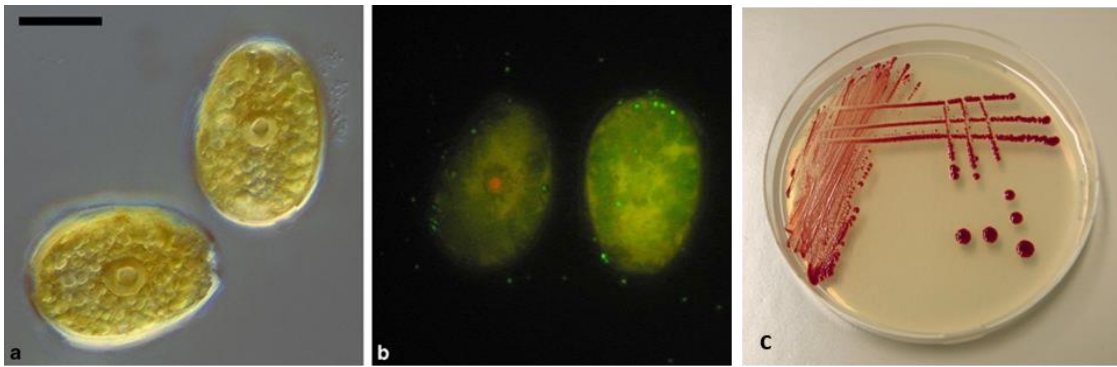


Abb. 3: Mikroskopische und Makroskopische Betrachtung des marinen Bakterium *D. shibae*. A: DIC (Differential interference contrast) Abbildung eines Dinoflagellaten einer nicht axenischen Kultur, dem 2 Monate zuvor Zellen des DFL12^T Stamms zugegeben worden sind. B: CARD-Fish (Catalysed reporter deposition fluorescent in situ hybridization) mit Dinoroseobacter spezifischer 16 S rRNA Markierung. Die meisten Zellen von *D. shibae* DFL12^T (grüne Punkte) sind angeheftet an die Oberfläche des Dinoflagellaten (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). C: Agar Platte von aerob kultivierten *D. shibae* Zellen mit ihrer charakteristischen roten Pigmentierung (Wozniczka, DSMZ, Braunschweig, Germany).

Für den *D. shibae* DFL12^T Wildtypstamm war bereits ein vermindertes Wachstum in der Abwesenheit von Eisen gezeigt worden (Jacobs, TU Braunschweig, unveröffentlichte Daten). Bei der Bestimmung des Wachstums von *D. shibae* in An- und Abwesenheit von 15 μM FeSO_4 wurde die OD_{578} stündlich im Biolektor vermessen. Der Wildtypstamm zeigte eine Latenz-Phase von 10-15 Stunden, in der sich die Bakterien an das Medium adaptieren und geht dann in eine logarithmische Wachstumsphase über (Abb. 4). Aufgrund der geringeren Steigung in der exponentiellen Wachstumsphase war erkennbar, dass der *D. shibae* Wildtypstamm ohne Eisen ein verringertes Wachstum im Vergleich zur Kultur mit Eisen aufwies. Die Wachstumsrate in Anwesenheit von Eisen lag bei 0,4 μ (*h⁻¹) und in der Abwesenheit von Eisen bei 0,1 μ (*h⁻¹). In Anwesenheit von Eisen tritt der *D. shibae* Wildtypstamm nach ca. 28 Stunden in eine stationäre Wachstumsphase ein mit einer maximalen OD_{578} von ca. 4,5. Unter Eisenmangel geht der *D. shibae* Wildtypstamm erst nach ca. 35 Stunden in eine stationäre Wachstumsphase über mit einer maximalen OD_{578} von 2,6. Dieses verminderte Wachstum zeigt deutlich den Einfluss von Eisen auf das Wachstum von *D. shibae*.

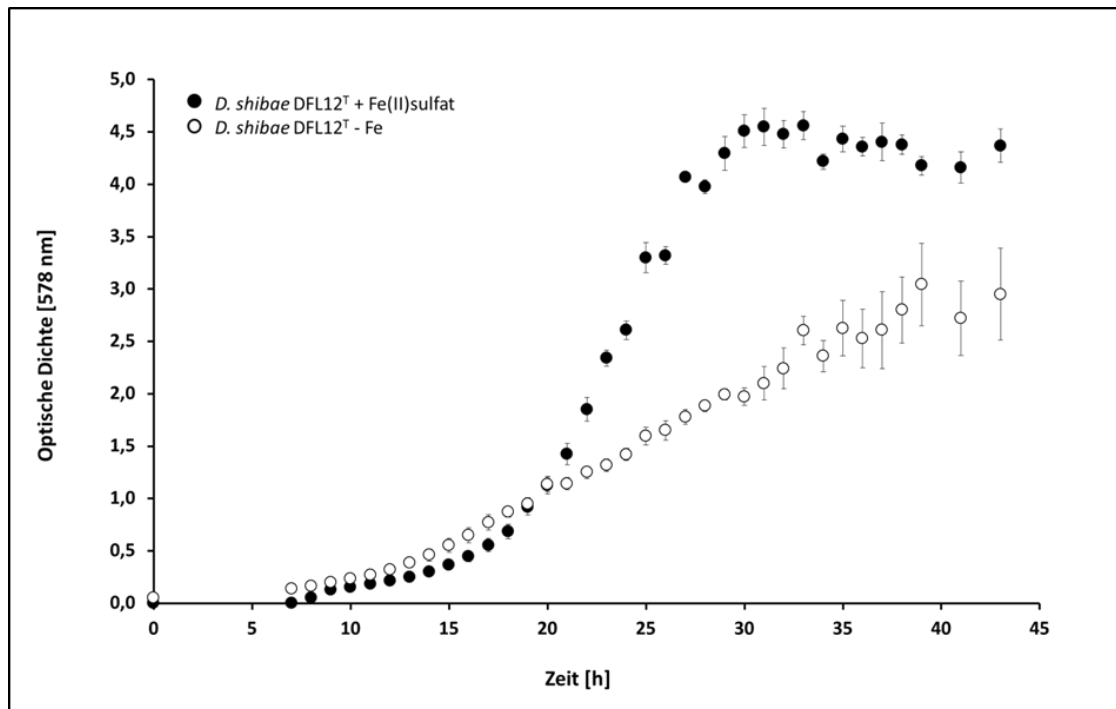


Abb. 4: Wachstumskurven des DFL12^T Wildtypstamms. Der Stamm DFL12^T wurden mit einer Start OD₅₇₈ von 0,05 in SWM Medium mit 15 µM FeSO₄ (+ Fe(II) Sulfat, schwarze Datenpunkte) und ohne die Zugabe von Eisen (-Fe, weiße Datenpunkte) angeimpft. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von 35 h durch photometrische Messung der OD₅₇₈ im Biolector bestimmt (Jacobs, TU Braunschweig, unveröffentlichte Daten).

1.3 Eisenaufnahmesysteme in Bakterien

Für die Anpassung an Eisenmangel besitzen Bakterien verschiedene Systeme zur Aufnahme von Eisen aus ihrer Umgebung. Die Fe²⁺ Form des Eisens ist besonders unter anaeroben Bedingungen stabil und löslich. Lösliches Fe²⁺ bedarf daher keiner Liganden zur Komplexbildung und kann direkt über Porine aufgenommen werden. Eines der ersten in Bakterien untersuchten Aufnahmesysteme für Fe²⁺ war das Feo System, welches zuerst in *E. coli* entdeckt worden ist. Das Feo System besteht aus einem Transmembranprotein FeoB, welches selektiv nur Fe²⁺ transportiert und zwei cytoplasmatischen Proteinen FeoA und FeoC, wobei diese beiden Teile ausschließlich in *Enterobacteriaceae* zu finden sind (Abb. 5) (Lau *et al.*, 2016). In pathogenen Bakterien wird auch oft das SitABCD System für die Aufnahme von zwei-wertigem Eisen gefunden (Abb. 5). Allerdings konkurriert dieses System mit der Verfügbarkeit von Mangan, da der ABC Transporter sowohl Eisen als auch Mangan in die Zelle transportieren kann (Carpenter & Payne, 2014).

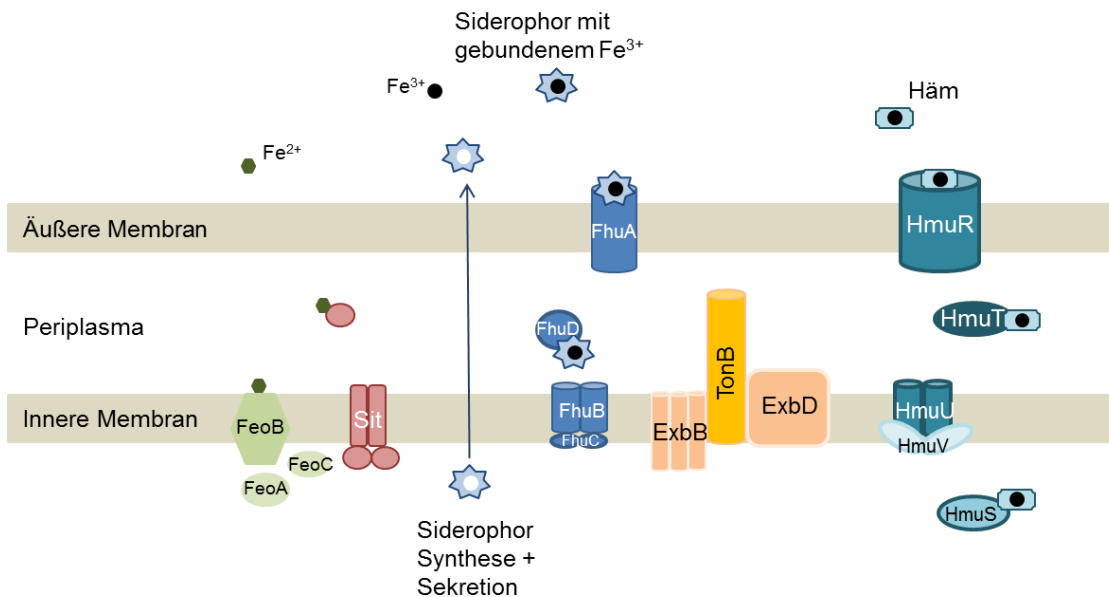


Abb. 5: Schematische Übersicht möglicher Eisenaufnahmesystem in Bakterien. Gezeigt wird die schematische Darstellung des Feo Systems für die Aufnahme von Fe^{2+} , ebenso wie das SitABCD Aufnahmesystem, das Siderophor Aufnahme- und Transportsystem FhuACDB, der TonB-ExbB-ExbD Komplex sowie das Hämin Aufnahmesystem HmuRSTUV.

Wie einleitend beschrieben, ist unter aeroben Bedingungen die Fe^{3+} Form des Eisens häufiger vorzufinden. Da es sich bei der Fe^{3+} Form allerdings um die unlösliche Form handelt, werden zur Aufnahme von Fe^{3+} Liganden benötigt. Eine Möglichkeit der Aufnahme von Fe^{3+} ist die Bindung des Eisens an Siderophore. Siderophore sind Komplexbildner mit einer hohen Affinität für dreiwertige Ionen. Diese Spezifität für dreiwertige Ionen ist von besonderer Bedeutung, da es deutlich mehr zweiwertige Ionen wie Kupfer (II), Kobalt (II) oder Nickel (II) gibt und nur Eisen sowohl in der zweiwertigen Form als auch in der dreiwertigen Form vorkommt. Daher sind Siderophore spezifisch für die Bindung von dreiwertigem Eisen (Hider & Kong, 2010). Es wurden bislang über 500 verschiedene Siderophore entdeckt deren Größen zwischen 500 -1500 Dalton liegen. Sie gehören in die Stoffgruppen der Catecholaten, Hydroxamate oder zu den α -Hydroxy/ α -Ketocarbonsäuren (Neilands, 1995). Viele Bakterien sind in der Lage eigene Siderophore zu produzieren und diese in ihre nähere Umgebung zu entlassen. Je nach Typ können diese auch an der äußeren Membran verankert werden und so selektiv nur dem eigenen Bakterium dienen. Siderophore, die in die Umgebung entlassen werden, können auch von Bakterien aufgenommen werden, die selbst nicht in der Lage sind Siderophore zu produzieren. Diese Siderophore werden Xenosiderophore genannt (Johnstone & Nolan, 2015). Siderophore mit gebundenem Eisen werden über energieabhängige Porine vom extrazellulären

in den periplasmatischen Raum transportiert (Neilands, 1995). Eines dieser Transportsysteme ist FhuACDB (Abb. 5). FhuA ist ein β -Fass, welches aus 22 β -Faltblättern gebildet wird, die äußere Membran durchspannt und als TonB abhängiger Rezeptor für die Bindung von Siderophore fungiert (Braun, 2009). Zur Energetisierung dieses Prozesses wird die protonenmotorische Kraft benötigt. Diese Energie wird durch den TonB-ExbB-ExbD Komplex vermittelt (Abb. 5). ExbB ist ein cytoplasmatisches Membranprotein, welches aus drei Transmembrandomänen aufgebaut ist. ExbD hat ähnlich wie TonB nur eine Transmembrandomäne und eine periplasmatische Domäne. ExbB und ExbD koppeln an TonB zum Aufbau des Protonengradienten (Krewulak & Vogel, 2008). Der genaue Prozess der Übertragung bzw. Bereitstellung der Energie ist noch unbekannt (Noinaj *et al.*, 2010). Den Transport der Siderophore durch den periplasmatischen Raum übernimmt dann das Substrat bindende Protein FhuD. Dieses liefert das Fe^{3+} Hydroxamat an das membranständige Protein FhuB in der inneren Membran, wobei die benötigte Energie durch FhuC, das eine ATPase Funktion hat, geliefert wird (Mademidis *et al.*, 1997; Braun *et al.*, 1998).

Neben der Aufnahme von Fe^{3+} durch Siderophore, kann das drei-wertige Eisen auch als Häm aufgenommen werden. Die Aufnahme von Häm und Hemoproteinen als Eisenquelle aus der Umgebung wird durch das Hämin Aufnahmesystem HmuRSTUV gesteuert (Abb. 5). HmuR ist der TonB-abhängige Rezeptor in der äußeren Membran, der für die Aufnahme verantwortlich ist. HmuTUV ist ein ABC Transporter, wobei HmuT für den Transport durch den periplasmatischen Raum und HmuUV für den Transfer durch die innere Membran in den cytoplasmatischen Raum verantwortlich ist. Hier erfolgt eine anschließende Degradation des Häms durch HmuS (Schwiesow *et al.*, 2018). Durch die Entwicklung vielfältiger Aufnahmesysteme verschiedener Eisenquellen haben Bakterien Strategien gefunden um mit dem Mangel an Eisen umzugehen.

1.4 Regulation der Eisenaufnahme in Bakterien

Im Gegensatz zur Eisenlimitation wirkt ein Überschuss an Eisen in der Zelle toxisch auf das Bakterium, daher benötigen Bakterien eine fein abgestimmte Regulation, um sowohl bei Eisenmangel als auch bei einem Überangebot an Eisen entsprechend reagieren zu können (Halliwell & Gutteridge, 1984). In vielen Bakterien wird diese Adaptation an sich verändernde Eisenverfügbarkeiten durch den Ferric uptake regulator Fur reguliert. Der Fur Regulator gehört zur Fur Familie der Transkriptionsfaktoren, von denen einige Mitglieder neben Eisen auch in der Lage sind andere Metalle wie Mangan (Mur), Zink (Zur)

oder Nickel (Nur) zu messen (Lee & Helmann, 2007). Der Fur Regulator aus *E. coli*, der auch in vielen anderen Gram negativen Bakterien sowie einigen Gram-positiven Bakterien gefunden worden ist, agiert in der Anwesenheit von Eisen als Repressor für Gene der Eisenaufnahme wie z.B. *fhuA*. Als Dimer kann der Fur Regulator freies Fe^{2+} inkorporieren und an die spezielle hexamere Bindesequenz GATAAT, die sogenannte Fur-Box binden (Braun, 2003). Durch die Bindung von Fur an den Promotorbereich der Gene für die Eisenaufnahme kann die Polymerase nicht mehr binden und die folgenden Gene können nicht mehr abgelesen werden (Abb. 6).

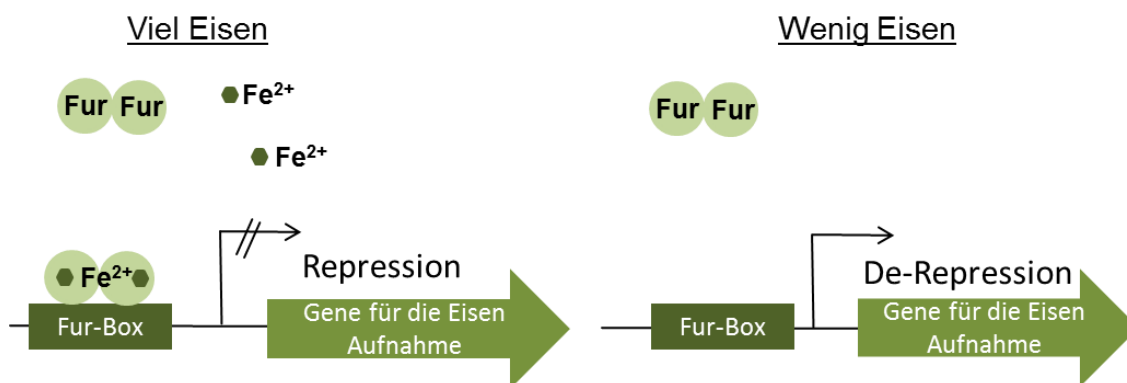


Abb. 6: Schematische Darstellung der Fur Regulation. In der Anwesenheit von Eisen bindet der dimere Fur Regulator freies Fe^{2+} durch Bindung an die spezifische Fur Box. Dies führt zur Repression der Gene für die Eisenaufnahme. Unter Eisenmangel steht dem Fur Regulator kein freies Fe^{2+} zur Verfügung, es findet keine Bindung an den Promotor statt und die Gene werden durch De-Repression exprimiert.

Während Eisenmangel wird das freie Fe^{2+} in anderen Proteinen, die Eisen binden können, benötigt und der Fur Regulator kann ohne gebundenes zwei-wertiges Eisen nicht mehr an seine spezifische Bindestelle binden. Es kommt zu einer De-Repression der Fur-regulierten Gene (Abb. 6). Neuere Studien hingegen zeigten, dass der Fur Regulator aus *E. coli* nicht nur in seiner *holo* Form als Repressor agiert sondern sowohl in seiner *apo* als auch *holo* Form als Aktivator Genexpression induzieren kann (Seo *et al.*, 2014). In *E. coli* wurden 65 Gene identifiziert, die über *holo*-Fur als Repressor reguliert werden. Fur als Aktivator aktiviert in seiner *holo* Form 11 Gene und in seiner *apo* Form nur ein Operon (Seo *et al.*, 2014). Indirekt hat der Fur Regulator auch einen positiven Einfluss auf Gene, welche für Proteine codieren, die Eisen beinhalten. Dies geschieht durch die Repression der Synthese der „anti-sense“ RNA *rhyB* (Braun, 2003; Massé & Arguin, 2005). In *B. subtilis* reguliert der Fur Regulator als Repressor in der Anwesenheit von Eisen rund 20 Operons die für über 40 Gene kodieren (Ollinger *et al.*, 2006). Zwar ist Fur der am weitesten verbreitete Regulator für die Eisen Adaptation in Bakterien, dennoch gibt es

einige Bakterien wie die Rhizobien, die ganz ohne den Fur Regulator auskommen. Rhizobien und einige α -Proteobakterien nutzen zur Regulation der Eisenaufnahme den Iron response regulator Irr, der ebenfalls zur Fur Familie von Transkriptionsfaktoren zählt. Irr wurde erstmals in *Bradyrhizobium japonicum* als Regulator der Eisen Homöostase entdeckt (Hamza *et al.*, 1998). Irr ist im Gegensatz zu Fur in Abwesenheit von Eisen in der Lage an die DNA zu binden und Irr-abhängige Gene zu reprimieren (Abb. 7). Der Irr Regulator wird in Anwesenheit von Eisen durch die Bindung von Häm proteolytisch degradiert, wodurch es zu einer De-Repression von Genen z. B. für den Aufbau von Fe-S Clustern kommt (Qi *et al.*, 1999). Als Erkennungssequenz für den Irr Regulator dient das sogenannte ICE (iron-control element), das aus einer palindromischen Sequenz von 17 bp mit der Sequenz 5'-TTTA-N₉-TAAA-3' besteht (Rudolph *et al.*, 2006). Die ICE Box ist auch vor Genen der Häminaufnahme wie *hmuR* und *hmuT* zu finden (Rudolph *et al.*, 2006). Die Familie der *Bradyrhizobiaceae* unterscheidet sich von anderen Familien der Rhizobien dadurch, dass sie zusätzlich zum Irr auch den Fur Regulator zur Eisenregulation nutzen. Der Fur Regulator in *Bradyrhizobium japonicum* reguliert direkt die Expression des *irr* Gens. In *R. leguminosarum* ist Irr einer der zwei Hauptregulatoren der Eisenaufnahme, ähnlich wie in den anderen Familien der Rhizobien (Todd *et al.*, 2002).

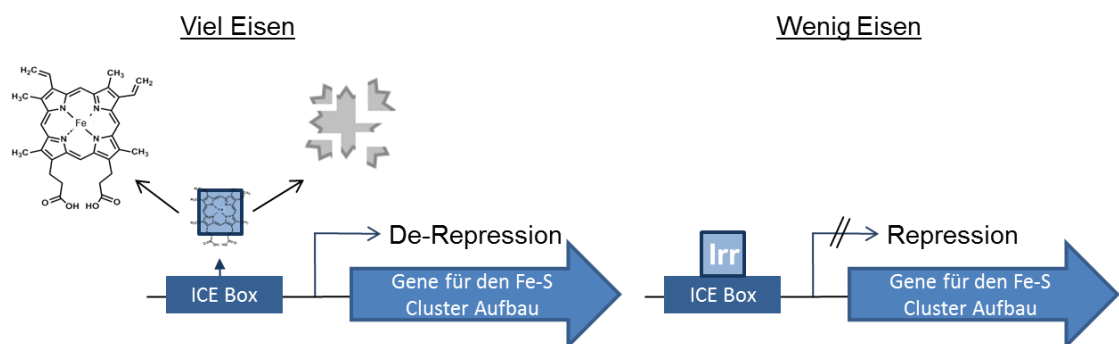


Abb. 7: Schematische Darstellung der Irr Regulation. In der Anwesenheit von Eisen bindet der Irr Regulator Häm. Dies führt zu einem proteolytischen Abbau des Irr Regulators, wodurch Irr nicht länger als Repressor fungiert. Es kommt zu einer De-Repression. In der Abwesenheit von Eisen bindet Irr an seine spezifische ICE Box und reprimiert eisenabhängige Gene.

Neben dem Irr Regulator nutzen viele α -Proteobakterien und Rhizobien auch den Rhizobial iron regulator RirA zur Anpassung an sich verändernde Eisenbedingungen. Der RirA Regulator wurde erstmals in *R. leguminosarum* beschrieben, wo er eisenabhängig Gene für die Aufnahme von Siderophoren wie *fhuA* reguliert (Todd *et al.*, 2002). RirA gehört anders als Fur und Irr nicht zur Fur Familie von Transkriptionsfaktoren, sondern zur Rrf2 Familie. Weitere Mitglieder dieser Familie sind z. B. der IscR Regulator aus *E. coli* oder der NsrR Regulator aus *B. subtilis* (Schwartz *et al.*, 2001; Kommineni *et al.*,

2012). Viele Mitglieder dieser Familie weisen drei hoch konservierte Cysteine auf, die für die Koordination von Fe-S Clustern benötigt werden (Rudolph *et al.*, 2006). Erste Hinweise deuten darauf hin, dass RirA ähnlich wie IscR abhängig von der Verfügbarkeit von Fe-S Clustern seine Zielgene reprimiert (Todd *et al.*, 2006). Für den RirA Regulator aus *A. tumefaciens* konnte gezeigt werden, dass neben der Repressorfunktion für den *sufS2* Promotor auch die Cysteine an Position 91, 99 und 105 wichtig für die Funktion von RirA sind (Bhubhanil *et al.*, 2014). Als potentielle Bindestelle für RirA wurde die sogenannte IRO Box (iron responsive operator) mit dem Motiv 5'-TGA-N₉-TCA-3' bioinformatisch identifiziert (Rodionov *et al.*, 2006). Für den RirA Regulator aus *R. leguminosarum* konnte die Bindung an den Promotorbereich von *fhuA*, der eine solche IRO Box enthält, beobachtet werden (Pellicer Martinez *et al.*, 2017). Als Kofaktor für den RirA Regulator aus *R. leguminosarum* wurde ein sauerstofflabiles und fragiles [4Fe-4S] Cluster identifiziert, welches eine wichtige Rolle bei der Bindung von RirA an die DNA spielt (Pellicer Martinez *et al.*, 2017).

Interessanterweise weist der Promotorbereich von *rirA* in *R. leguminosarum* sowohl das Bindemotiv der ICE Box als auch eine IRO Box auf. Dies spricht für eine Co-Regulation von Irr und RirA für das *rirA* Gen (Todd *et al.*, 2006).

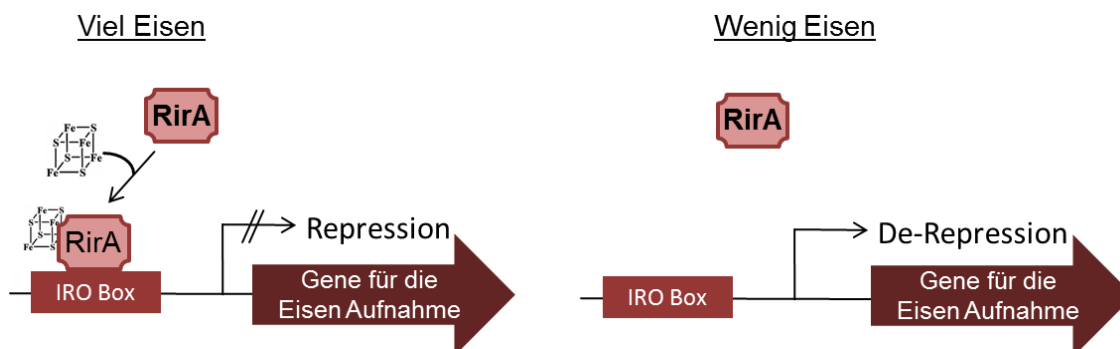


Abb. 8: Schematische Darstellung der RirA Regulation. In der Anwesenheit von Eisen bindet der RirA Regulator ein Fe-S Cluster. Durch das gebundene Fe-S Cluster ist der RirA Regulator in der Lage an die IRO Box zu binden und es kommt zur Repression von Genen der Eisenaufnahme. Zu einer De-Repression dieser Gene kommt es unter Eisen limitierenden Bedingungen, wenn keine freien Fe-S Cluster mehr vorhanden sind und der RirA Regulator nicht mehr binden kann.

Für die Funktion von RirA als Repressor bedeutet das, dass in der Anwesenheit von Eisen RirA ein Fe-S Cluster bindet und so an die spezifische IRO Box binden kann, was zu einer Repression von Genen für die Eisenaufnahme führt (Abb. 8). Unter Bedingungen in denen Eisenmangel herrscht, kann RirA ohne das Fe-S Cluster nicht an die IRO Box binden. Durch die resultierende De-Repression kommt es zur Aktivierung von Genen für

die Eisenaufnahme (Pellicer Martinez *et al.*, 2017). Der RirA Regulator benötigt ein intaktes Fe-S Cluster für seine Repressor Funktion.

Fe-S Cluster werden entweder durch das ISC System oder das SUF System bereitgestellt. In einigen Bakterien wie *E. coli* sind beide Systeme vorhanden, wobei das SUF System nur unter Stressbedingungen aktiviert wird (Mettert & Kiley, 2015). Die Fe-S Cluster Biogenese in *E. coli* wird durch den Iron sulfur cluster Regulator IscR gesteuert. IscR ist in der Lage ein $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ Cluster als Kofaktor zu binden und so die Expression von Fe-S Cluster Biogenese Genen zu reprimieren (Schwartz *et al.*, 2001). Das $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ aus *E. coli* IscR wird über drei Cysteine an Position 92, 98, und 104 zusammen mit einem hoch konserviertem Histidin an Position 107 koordiniert (Fleischhacker *et al.*, 2012). In Anwesenheit von Eisen und damit einhergehender Verfügbarkeit von Fe-S Clustern bindet IscR das $[2\text{Fe-2S}]$ Cluster und kann über seine spezifische Erkennungssequenz 5'-GA-N₉-TC-3', die sogenannte Iron Rhodo Box an den Promotorbereich seiner Zielgene binden. Hierdurch kommt es zur Repression der Gene für die Fe-S Cluster Biogenese (Abb. 9). In Abwesenheit von Eisen, stehen nicht ausreichend ungebundene Fe-S Cluster zur Verfügung und IscR liegt in seiner Apo-Form vor, was zu einer De-Repression der Fe-S Biogenese Gene führt (Santos *et al.*, 2015). Allerdings kann der IscR Regulator auch in seiner *apo*-Form zur Repression dieser Gene führen, wobei eine deutlich schwächere Affinität zu der Bindestelle beobachtet werden konnte (Santos *et al.*, 2015). Zusätzlich kann IscR seine eigene Expression autoregulieren. Das *iscR* Gen bildet den Anfang des *iscRSUA-hscBA-fdx-iscX* Operons, somit ist der Promotor von *iscR* ebenfalls der regulierende Promotor des ISC Systems (Santos *et al.*, 2015).

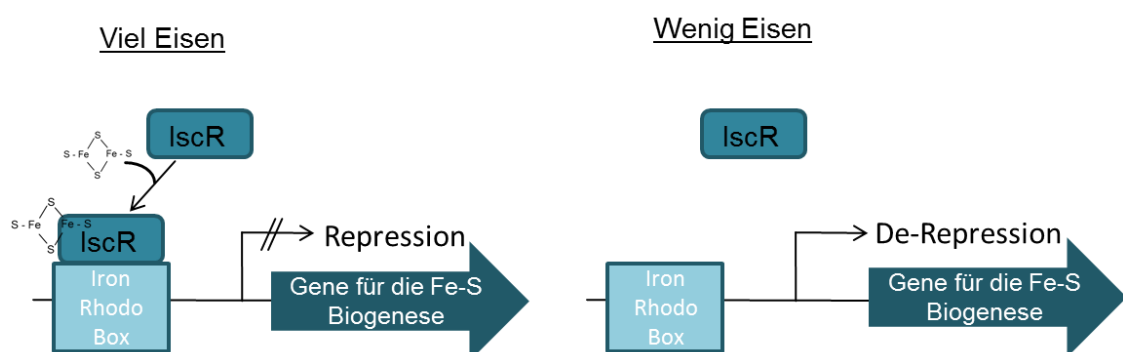


Abb. 9: Schematische Darstellung der IscR Regulation. In der Anwesenheit von Eisen bindet der IscR Regulator ein $[2\text{Fe-2S}]$ Cluster als Kofaktor. Durch das gebundene Fe-S Cluster kommt es zur Bindung des IscR Regulators an die spezifische Iron Rhodo Box und zur Repression der Gene für die Fe-S Biogenese. Zu einer De-Repression dieser Gene kommt es unter Eisen limitierenden Bedingungen, durch den entstehenden Mangel an freien Fe-S Cluster wodurch der IscR Regulator nicht mehr spezifisch binden kann.

Der IscR Regulator aus *Rhodobacter sphaeroides* ist im Unterschied zum IscR Regulator aus *E. coli* auch an der Regulation von Eisenaufnahmesystemen beteiligt. In *R. sphaeroides* ist der IscR Regulator nicht nur an der Regulation der ISC und SUF Gene sondern auch an der Regulation der Gene *exbB*, *exbD* und weiterer TonB abhängiger Proteine, sowie den Genen *feoB*, *feoA1* und *feoA2* für die Aufnahme von Fe^{2+} beteiligt (Remes *et al.*, 2015). Ein weiterer Unterschied zu IscR aus *E. coli* ist die Koordination des Fe-S Clusters. Der IscR Regulator aus *R. sphaeroides* besitzt nur ein Cystein in seiner Sequenz und muss daher das Fe-S Cluster über andere bislang nicht identifizierte Liganden binden (Remes *et al.*, 2015).

Das Genom von *D. shibae* weist Homologe Gene für den Fur und Irr Regulator auf. Für den Fur Regulator kodiert das Gen *Dshi_2142* und für den Irr Regulator das Gen *Dshi_1011* (Jacobs, TU Braunschweig, unveröffentlichte Daten).

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Charakterisierung der eisenabhängigen Transkriptionsregulatoren RirA und IscR und die Untersuchung des regulatorischen Netzwerks für die Adaptation des marinen Bakteriums *D. shibae* an Eisenmangel.

Zur Analyse der Rolle der Regulatoren RirA und IscR in der Anpassung an Eisenmangel sollten genomische Deletionsmutanten der *rirA* und *iscR* Gene hergestellt werden und vergleichend mit den bereits vorhandenen Transposonmutanten für die Regulatoren Fur und Irr untersucht werden. Hierzu sollten zunächst die Wachstumsphänotypen der Regulatormutantenstämme Δfur , Δirr , $\Delta rirA$ und $\Delta iscR$ in An- bzw. Abwesenheit von Eisen mit dem des *D. shibae* DFL12^T Wildtypstamms verglichen werden. Um zu prüfen ob der Wachstumsphänotyp der speziellen Genmutation zuzuschreiben ist, soll eine *in vivo* Komplementation erfolgen. Über Transkriptomanalysen der RNA aus den $\Delta rirA$ und $\Delta iscR$ Regulatormutantenstämmen im Vergleich mit dem *D. shibae* DFL12^T Wildtypstamm soll das RirA sowie das IscR Regulon definiert werden und der Einfluss von Eisen auf die Genregulation untersucht werden. Die Eisenmangel-induzierte Genexpression soll mittels Promoter-Reporterfusion einzelner identifizierter Targetgene in Abhängigkeit der Regulatoren RirA, IscR sowie Fur und Irr im Vergleich untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die biochemische Charakterisierung der Regulatoren RirA und IscR aus *D. shibae*. Hierfür sollten beide Proteine zunächst rekombinant in *E. coli* produziert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Im Anschluss sollten die Kofaktoren des RirA und des IscR Regulators jeweils mit Hilfe biochemischer und biophysikalischer Methoden wie die UV/ Vis Spektroskopie, ESR Spektroskopie oder Mössbauer Spektroskopie identifiziert werden. Mit Hilfe molekularbiologischer Experimente sollte die Bindeaktivität der Transkriptionsfaktoren über Protein/DNA Interaktion und Footprintanalysen charakterisiert werden. Darüber hinaus sollten Mutationsanalysen der Regulatoren zum Einsatz kommen und soweit möglich Strukturanalysen nach Kristallisation der Regulatoren durchgeführt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 1: verwendete Geräte und technische Anlagen

Gerät	Modell	Hersteller
Agarosegelelektrophorese	Agagel Mini	Biometra
Anaerobenbox	Anaerobic workstation	West Yorkshire, UK
Anaerobenzelt		Coy Laboratory Products inc., Michi- gan, USA
Autoklav	FVA/A1	Fedegari AG
Array Scanner		Agilent
Äkta-Purifier	Äkta™ Purifier	GE Healthcare
Bioanalyzer	Agilent 2100	Agilent
Chemilumineszenz Doku- mentationsanlage	CoolSNAP HQ ²	Photometrix
Elektroporation	Gene Pulser II mit Pulse Contoller	BioRad
French Press	French Cell Press	Thermo scientific
Geldokumentationsanlage	UV Transilluminator	Wealtec Europe
Mikroskop	SZX9	Olympus
pH-Meter	pH-Meter C 6840B	Schott
Photometer	Ultrospec 2000	Amersham Biosciences
Nanodrop	Nanodrop ND-1000	Millipore
<i>Real -Time</i> Thermal Cycler	CFX- 96 Real-Time System	Biorad
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore
Rollentaumelmischgerät	RM5	Ingenieurbüro CAT
Röntgenfilm -Entwicklung- maschine	Optimax Typ TR	MS Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Röntgenfilm	Fuji Super RX	Fuji
SDS-PAGE-Apparatur	Mini Protein III	BioRad
Semidry-Blot	Trans-Blot® SD	BioRad
Sterile Werkbank	HERAsafe	Heraeus
Thermocycler	T personal	Biometra
Thermoblock	Thermomixer compact	Eppendorf
Ultraschallbad	Ultraschallbad	VWR International
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 2400	Stratagene
UV/VIS-Spektrophotometer	V-550 / V-650	Jasco
Waagen	Feinwaage	Kern
	Acculab	Sartorius
Wasserbadschüttler	Aquatron	Bottmingen
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen	Eppendorf MiniSpin	Eppendorf
	Biofuge fresco	Heraeus
	Megafuge 1,0 R	Heraeus
	Avanti® J-30I	Beckman Coulter
	L-765 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Zentrifugenrotoren	JLA-8.1000	Beckman Coulter
	Ti-70.1	Beckman Coulter

3.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammen, falls nicht anders angegeben, von folgenden Firmen: Merck (Darmstadt, Deutschland), New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Thermo Scientific (St. Leon Roth, Deutschland).

3.3 Kommerzielle Kits, Enzyme, Fertiglösungen und Oligonukleotide

Die kommerziell erhältlichen Kits sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
ECL TM Prime Westerns Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
DIG Gel Shift Kit	Roche
2D-Quant Kit	GE Healthcare
Q5-Site directed Mutagenesis Kit	NEB
CDP-Star	Roche
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNase-free DNase Set	Qiagen
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent
USL Fluorescent Labeling Kit	KREATECH
Gene Expression Microarray Hybridization Kit	Agilent
Gene Expression Microarrays Fragmentation Kit	Agilent

Die kommerziell erhältlichen Enzyme sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
PreScission Protease	GE Healthcare
DNaseI	AppliChem
Lysozym	Roth
T4-Polymerase	NEB
Q5-Polymerase	NEB
Phusion Polymerase	NEB
SmaI	NEB
DpnI	NEB
HindIII	NEB

Enzym	Hersteller
KpnI	NEB
SphI-HF	NEB
SacI-HF	NEB
NdeI	NEB
XhoI	NEB
PstI	NEB
XmaI	NEB

Die kommerziell erhältlichen Fertiglösungen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Fertiglösungen

Fertiglösung	Hersteller
InstantBlue™	Merck
RNase Away®	Qiagen
RNA Protect®	Qiagen
Eisenstandard für AAS	Merck
Schwefelstandard für AAS	Fluka

Tabelle 5: Übersicht über in dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide und Primer

Primer	Sequenz
EH568	5'-TCCCCCGGG-ATGCGCCTTACGACCCGA-3'
EH569	5'-GCGAGCTC-TCAGGCTGGCGCTGTGAC-3'
EH575	5'-CCGCGGGCTTTCCCAGC-CAAGGTCCTGCACTGTGA-3'
EH576	5'-G TTCCTCCTTCCCACC-TTCGGCAGTGTGGTTGAG-3'
EH577	5'-CCGCGGGCTTTCCCAGC-AAGATCAGGCAGGATAAC-3'
EH578	5'-G TTCCTCCTTCCCACC-AACGGCTCCGCTTCGGATG-3'
EH579	5'-CCGCGGGCTTTCCCAGC-ACACTTGTCTGAAATGGC-3'
EH580	5'-G TTCCTCCTTCCCACC-CTG TTCCTGTATGTGGAGA-3'
EH585	5'-TCCCCCGGGGTGAAACTCAGTACC-3'
EH586	5'-GCAGACTCTCAGTTCGCAACTGCGTC-3'
EH590	5'-GATCGGCTTGATACGTTTCCT-3'

Primer	Sequenz
EH591	5'-GATGACTTGTCCGAGATGGT-3'
EH599	5'-CGCCACCTAACAATTCGTTC-3'
EH603	5'-GGGGCGCACGCCCCGTGGCC-3'
EH604	5'-GGGACCCTCGCAGATTGG-3'
EH611	5'-GCGAAGCTT-AGTTCGCGGGCAGTATCA-3'
EH612	5'-TGCACTGCAGAGCAGACCGTAACACCGC-3'
EH613	5'-TGCACTGCAG-GGCGTTGTGACAATTTAC-3'
EH614	5'-ATGGGATCC-GACGCACACCGTGGAACG-3'
EH615	5'-ATGGGATCC-ATCGACGGAGAACATTGATG-3'
EH616	5'-GGGGTACC-GCGTACGGGTCTTCTCGTCA-3'
EH619	5'-ACATGCATGC-ACCGTCATTGCCGCCATAGA-3'
EH620	5'-GTTCTAGATTGCCCCGATTGAATTCGT-3'
EH621	5'-GCTCTAGA-GGCGTTGTGACAATTTACC-3'
EH622	5'-ATAAGAATGCGGCCGC-ACGGATGAAGGCACGAACC-3'
EH623	5'-ATAAGAATGCGGCCGC-TCGATGACCAACCGGCT-3'
EH624	5'-GGCGAGCTC-ACCTTCCCGCTGGAACAGG-3'
EH631	5'-ATCCAGGCTCCGAAGGAGAA-3'
EH632	5'-TGGTCACCACGTCAGACAAG-3'
EH636	5'-CCGCTCGAG-3'
EH639	5'-CAGAGAGCTC-AGTATCTTGAGGGGCTTC-3'
EH641	5'-GGAAATTCCAT-ATGGCAAGCTGGAGCCA-3'
EH642	5'-TGCACTGCAG-TCAGGCTGGCGCTGTGAC-3'
EH644	5'-TGCACTGCAG-GGCTGGCGCTGTGACCGG-3'
EH647	5'-GCGACCCTAAACCCTTAT-3'
EH648	5'-TCATGTCGCTTCCTAGGT-3'
EH656	5'-GTTTCCTCCTTCCCACC-TCATGTCGCTTCCTAGGT-3'
EH657	5'-CCGCGGGCTTTCCCAGC-GCGACCCTAAACCCTTAT-3'
EH658	5'-GTTTCCTCCTTCCCACC-GGCCCTTGGTACTGAGTT-3'
EH659	5'-CCGCGGGCTTTCCCAGC-CAGGTTATAGACCACGCG-3'
EH683	5'-ATGGATGCCTGTCCTCTCAC-3'
EH684	5'-GGCCCTTGGTACTGAGTT-3'
EH687	5'-CCGCGGGCTTTCCCAGC-TGATGTCGGGCCTGATTT-3'

Primer	Sequenz
EH688	5'-G TTCCTCCTTCCCACC-GTGGGTCAGCATCAACT-3'
EH691	5'-GGGGCGCACGCCCCGTGCC-3'
EH692	5'-GGGACCCTCGCAGATTGG-3'
EH695	5'-CCGCGGGGCTTCCCAGCGGGGCGCACGCCCCGTGCC-3'
EH696	5'-G TTCCTCCTTCCCACC GGGACCCTCGCAGATTGG-3'
EH715	5'-GGAAATTCCAT-ATGACCGATACGATCCTC-3'
EH716	5'-CAGAGAGCTC-TCACTTCTTCTTCATCGGC-3'
EH717	5'-GGAAATTCCAT-ATGCGCGCGCAAGGTTTG-3'
EH718	5'-CAGAGAGCTC-TCAGGCCTTGCGCAGCCG-3'
EH719	5'-GGAAATTCCATA-TGAAACTCAGTACCAAGGG-3'
EH720	5'-CAGAGAGCTC-TCAGTTCGCAACTGCGTCT-3'
EH721	5'-CCGCGGGGCTTCCCAGC-AAAACCCAGGAAACCCGC-3'
EH722	5'-G TTCCTCCTTCCCACC-CATGGACAGACCCCGGCTGG-3'
MB09	5'-GGAGTGC ACTGCGCCGCTGATTT CGG-3'
MB10	5'-TTGGCGTCGAAACACTCG-3'
MB11	5'-GCTCATGTATGCGGCGGTGCATACCGGGC-3'
MB12	5'-GTCCGCATGGCGAGGTTG-3'
MB13	5'-CTTTGCCGAGGCGTTTCGACGCCAAGGAGTGC-3'
MB14	5'-GGCGTTCCGGCTTCGAAC-3'
MB15	5'-GATTT CGGTTGCGCGGCTGAAAGGGGCC-3'
MB16	5'-AGCGGACAAGTGC ACTCC-3'
MB19	5'-CTTTCGTTAAATATGATTAAAACACTCGGGAATTATTCAGC-3'
MB20	5'-CTTTCGTTAAATACAGTTAAAACACGTCGGAATTATTCAGC-3'
MB21	5'-GCTGAATAATTCCCGAGTGTTTTAATCATATTTAACGAAAG-3'
MB22	5'-GCTGAATAATTCCGACGTGTTTTAACTGTATTTAACGAAAG-3'
MB29	5'-CTTTCGGCAAATACAGTTAAAACACGTCGGAAGCATTTCAGC-3'
MB30	5'-GCTGAATGCTTCCGACGTGTTTTAACTGTATTTGCCGAAAG-3'
MB31	5'-CTTTCGTTAAATATGAGCAAAACACTCGGGAAGCATTTCAGC-3'
MB32	5'-GCTGAATGCTTCCCGAGTGTTTTGCTCATATTTAACGAAAG-3'
MB33	5'-CTTTCGGCAAATATGATTAAAACACTCGGGAAGCATTTCAGC-3'
MB34	5'-GCTGAATGCTTCCCGAGTGTTTTAATCATATTTGCCGAAAG-3'
MB35	5'-CTTTCGTTAAATATGATTAAAACACTCGGGAAGCATTTCAGC-3'

Primer	Sequenz
MB36	5'-GCTGAATGCTTCCCGAGTGTTTTAATCATATTTAACGAAAG-3'
MB37	5'-CTTTCGGCAAATATGATTAACAACTCGGGAATTATTCAGC-3'
MB38	5'-GCTGAATAATTCCCGAGTGTTTTAATCATATTTGCCGAAAG-3'
MB39	5'-CTTTCGTAAATATGAGCAAAACACTCGGGAATTATTCAGC-3'
MB40	5'-GCTGAATAATTCCCGAGTGTTTTGCTCATATTTAACGAAAG-3'
MB41	5'-CCGCGGGCTTTCCCAGC-3'
T7-Prom	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

3.4 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in den nachfolgenden Tabellen beschrieben.

Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme dieser Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK 1- rpsL nupG</i>	Gibco Life Technologies
BL21CD+(DE3)RIL	<i>F-ompT hsdS(rB-mB-) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW (Cml)]</i>	Stratagene, USA
ST18	<i>E. coli</i> S17-1Δ <i>hemA thi pro hsdR</i> -M- chromosomal integrated [<i>RP4-2 Tc::Mu:Kmr::Tn7, Tra+ Trir Strr</i>]	(Thoma & Schobert, 2009)

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Dinoroseobacter shibae</i>		
DFL12 ^T	isoliert von dem Dinoflagellaten <i>Prorocentrum lima</i> , Typstamm, DSM16493 ^T	(Biebl <i>et al.</i> , 2005)
DSTn5775	<i>fur</i> (<i>Dshi_2142</i>)::Tn, <i>gm</i> ^r	Dissertation Jenny Ja- cobs
DS Tn 1849	<i>irr</i> (<i>Dshi_1011</i>)::Tn, <i>gm</i> ^r	Dissertation Jenny Ja- cobs
DS010	<i>ArirA</i> (<i>Dshi_1660</i>):: <i>gm</i> ^r	Diese Arbeit
DS011	<i>ΔiscR</i> (<i>Dshi_1633</i>):: <i>gm</i> ^r	Masterarbeit Kim Renn- hack
DS105	<i>DFL12</i> ^T ; pBBR1 <i>irpA-lacZ</i> , <i>cm</i> ^r	Diese Arbeit
DS106	<i>DFL12</i> ^T ; pBBR10575- <i>lacZ</i> , <i>cm</i> ^r	Diese Arbeit
DS109	<i>ArirA</i> (<i>Dshi_1660</i>):: <i>gm</i> ^r ; pBBR1 <i>irpA-lacZ</i> , <i>cm</i> ^r	Diese Arbeit
DS110	<i>DFL12</i> ^T ; pBBR1 <i>napF-lacZ</i> , <i>cm</i> ^r	Diese Arbeit
DS111	<i>ArirA</i> (<i>Dshi_1660</i>):: <i>gm</i> ^r ; pBBR1 <i>napF-lacZ</i> , <i>cm</i> ^r	Diese Arbeit
DS117	<i>DFL12</i> ^T ; pBBR1 <i>iscR-lacZ</i> , <i>cm</i> ^r	Diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
DS118	$\Delta iscR(Dshi_1633)::gm^r$; pBBR1iscR-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS119	$\Delta rirA(Dshi_1660)::gm^r$; pBBR1iscR-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS120	$\Delta irr(Dshi_1011)::gm^r$; pBBR1iscR-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS121	$\Delta iscR(Dshi_1633)::gm^r$; pBBR1irpA-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS122	$\Delta iscR(Dshi_1633)::gm^r$; pBBR10575-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS123	DFL12 ^T ; pBBR1ctrA-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS124	$\Delta rirA(Dshi_1660)::gm^r$; pBBR1ctrA-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS137	$\Delta fur(Dshi_2142)::gm^r$; pBBR1irpA-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS138	$\Delta irr(Dshi_1011)::gm^r$; pBBR1irpA-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS139	$\Delta fur(Dshi_2142)::gm^r$; pBBR10575-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS140	$\Delta irr(Dshi_1011)::gm^r$; pBBR10575-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS141	$\Delta rirA(Dshi_1660)::gm^r$; pBBR10575-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS142	DFL12 ^T ; pBBR1exbB-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS143	$\Delta fur(Dshi_2142)::gm^r$; pBBR1exbB-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS144	$\Delta irr(Dshi_1011)::gm^r$; pBBR1exbB-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS145	$\Delta rirA(Dshi_1660)::gm^r$; pBBR1exbB-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS146	DFL12 ^T ; pBBR1hemB2-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS147	$\Delta rirA(Dshi_1660)::gm^r$; pBBR1hemB2-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS148	$\Delta iscR(Dshi_1633)::gm^r$; pBBR1hemB2-lacZ, cm^r	Diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
DS149	<i>Δfur(Dshi_2142)::gm^r; pBBR1hemB2-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS150	<i>Δirr(Dshi_1011)::gm^r; pBBR1hemB2-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS151	<i>Δfur(Dshi_2142)::gm^r; pBBR1iscR-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS152	<i>ΔiscR(Dshi_1633)::gm^r; pBBR1exbB-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS153	<i>DFL12^T; pBBR1iscR195mer-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS154	<i>Δirr (Dshi_1011)::gm^r; pBBR1iscR195mer-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS155	<i>ΔiscR(Dshi_1633)::gm^r; pBBR1iscR195mer-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS156	<i>DFL12^T; pBBR1iscR195mer_mut1-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS157	<i>Δirr(Dshi_1011)::gm^r; pBBR1iscR195mer_mut1-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS158	<i>ΔiscR(Dshi_1633)::gm^r; pBBR1iscR195mer_mut1-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS159	<i>DFL12^T; pBBR1iscR195mer_mut2-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS160	<i>Δirr(Dshi_1011)::gm^r; pBBR1iscR195mer_mut2-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS161	<i>ΔiscR(Dshi_1633)::gm^r; pBBR1iscR195mer_mut2-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS162	<i>DFL12^T; pBBR1iscR195mer_mut3-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit
DS163	<i>Δirr(Dshi_1011)::gm^r; pBBR1iscR195mer_mut3-lacZ, cm^r</i>	Diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
DS164	$\Delta iscR(Dshi_1633)::gm^r$; pBBR1iscR195mer_mut3-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS165	$DFL12^T$; pBBR10575150mer-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS166	$\Delta rirA(Dshi_1660)::gm^r$; pBBR10575150mer-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS167	$\Delta fur(Dshi_2142)::gm^r$; pBBR10575150mer-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS168	$\Delta irr(Dshi_1011)::gm^r$; pBBR10575150mer-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS169	$\Delta iscR(Dshi_1633)::gm^r$; pBBR10575150mer-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS170	$\Delta rirA::gm^r$; pRhokSrirA, cm^r	Diese Arbeit
DS171	$\Delta fur::gm^r$; pRhokSfur, cm^r	Diese Arbeit
DS172	$\Delta irr::gm^r$; pRhokSirr, cm^r	Diese Arbeit
DS173	$\Delta iscR::gm^r$; pRhokSiscR, cm^r	Diese Arbeit
DS174	$DFL12^T$; pBBR1hmp-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS175	$\Delta rirA(Dshi_1660)::gm^r$; pBBR1hmp-lacZ, cm^r	Diese Arbeit
DS191	$\Delta rirA::gm^r$; pRhokS_aphII StrepIIrirA, cm^r	Diese Arbeit
DS192	$\Delta rirA::gm^r$; pRhokSrirA-StrepII, cm^r	Diese Arbeit

Tabelle 7: Verwendete Plasmide dieser Arbeit

Vektor	relevante Charakteristika	Referenz
pET52b(+)	<i>strepII</i> (Amp)	Novagen, Deutschland
pET52b(+) <i>rirA</i>	<i>StrepII rirA</i> (Amp)	Diese Arbeit
pET52b(+) <i>rirAC17A</i>	<i>StrepII rirAC17A</i> (Amp)	Diese Arbeit
pET52b(+) <i>rirAC91A</i>	<i>StrepII rirAC91A</i> (Amp)	Diese Arbeit
pET52b(+) <i>rirAC99A</i>	<i>StrepII rirAC99A</i> (Amp)	Diese Arbeit
pET52b(+) <i>rirAC105A</i>	<i>StrepII rirAC105A</i> (Amp)	Diese Arbeit
pET52b(+) <i>rirA</i> 5Cmut	<i>StrepII rirA5Cmut</i> (Amp)	Diese Arbeit
pET52b(+) <i>iscR</i>	<i>StrepII iscR</i> (Amp)	Bachelorar- beit Alina Rommers- kirch
pET52b(+) <i>iscR</i> C140A	<i>StrepII iscR C140A</i> (Amp)	Masterarbeit Kim Renn- hack
pET52b(+) <i>iscR</i> C140A/P141A	<i>StrepII iscR C140A/P141A</i> (Amp)	Masterarbeit Kim Renn- hack
pHPEX3-Kan	(Kan)	(Varnado & Goodwin, 2004)

Vektor	relevante Charakteristika	Referenz
pRKSUF017	<i>sufABCDSE-ynhG</i>	(Takahashi & Tokumoto, 2002)
pRKISC	<i>ORF1-iscRSUA-hscBA-fdx-iscX</i>	(Nakajima <i>et al.</i> , 2010)
pBBR1MCS LIC- <i>LacZ</i>	LIC cloning site, <i>lacZ</i> -Gen (Cm)	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR10575_480bp- <i>LacZ</i>	LIC cloning site, 0575_480bp- <i>lacZ</i> (480 bp) (Cm)	Diese Arbeit
pBBR10575_150bp- <i>LacZ</i>	LIC cloning site, 0575_150bp- <i>lacZ</i> (150 bp) (Cm)	Diese Arbeit
pBBR1irpA- <i>LacZ</i>	LIC cloning site, irpA_491bp- <i>lacZ</i> (491 bp) (Cm)	Diese Arbeit
pBBR1hemB2- <i>LacZ</i>	LIC cloning site, hemB2_155bp- <i>lacZ</i> (155 bp) (Cm)	Diese Arbeit
pBBR1iscR195bp- <i>LacZ</i>	LIC cloning site, iscR_195bp- <i>lacZ</i> (195 bp) (Cm)	Diese Arbeit
pBBR1exbB- <i>LacZ</i>	LIC cloning site, exbB_472bp- <i>lacZ</i> (472 bp) (Cm)	Diese Arbeit
pBBR1hmp- <i>LacZ</i>	LIC cloning site, hmp_180bp- <i>lacZ</i> (180 bp) (Cm)	Diese Arbeit
pBBR1 <i>iscRmut1</i> - <i>LacZ</i>	LIC cloning site, <i>iscR</i> _195bp- <i>lacZ</i> (195 bp), Mutation in IscR Bindestelle (Cm)	Diese Arbeit
pBBR1 <i>iscRmut2</i> - <i>LacZ</i>	LIC cloning site, <i>iscR</i> _195bp- <i>lacZ</i> (195 bp), Mutation in Irr Bindestelle (Cm)	Diese Arbeit

Vektor	relevante Charakteristika	Referenz
pBBR1 <i>iscRmut3-LacZ</i>	LIC cloning site, <i>iscR_lacZ</i> (195 bp), Mutation in <i>IscR</i> und <i>Irr</i> Bindestelle (Cm)	Diese Arbeit
pRhokS-2	<i>strepII</i> (Cm), <i>PaphII</i>	(Katzke <i>et al.</i> , 2010)
pRhokS- <i>apHII</i> StrepII- <i>rirA</i>	<i>strepII</i> (Cm), <i>PaphII</i> , <i>rirA</i>	Diese Arbeit
pRhokS- <i>rirA</i> StrepII	<i>strepII</i> (Cm), <i>rirA</i>	Diese Arbeit
pRhokS- <i>iscR</i>	<i>strepII</i> (Cm), <i>PaphII</i> , <i>iscR</i>	Diese Arbeit
pRhokS- <i>irr</i>	<i>strepII</i> (Cm), <i>PaphII</i> , <i>irr</i>	Diese Arbeit
pEX18Tc	suicide Vektor (Tet)	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pEX18Tc- <i>rirA</i>	suicide Vektor (Tet), <i>rirA</i>	Diese Arbeit
pEX18Tc- <i>iscR</i>	suicide Vektor (Tet), <i>iscR</i>	Diese Arbeit

3.5 Mikrobiologische Techniken

3.5.1 Sterilisation

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, für 20 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert und sterilisiert. Temperatursensitive Substanzen wie Antibiotika, IPTG, 5-Aminolevulinsäure und Avidin wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser: 0,2 µm, Sartorius).

3.5.2 Bakterienkultivierung auf Agarplatten

Zum Anlegen einer *E. coli* Kultur wurden „Lysogeny Broth“ (LB)-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika versetzt und nach der Trocknung mit einer sterilen Impföse Kulturmateriale aus einer Glycerinkultur entnommen und ausgestrichen (Sambrook & Russell,

2001). Bakterien, die aus einer Flüssigkultur entnommen worden sind, wurden mit einem sterilen Drigalski-Spatel ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C.

LB-Platte:	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	Trypton
	10 g/l	NaCl
	18 g/l	Agar-Agar

Für *D. shibae* Stämme wurde „Marine Broth“ (MB) Medium verwendet, das speziell für marine Organismen geeignet ist, die einen hohen Salzgehalt benötigen. Aufgrund dieses hohen Salzgehalts, ist von den verwendeten Antibiotika nur Chloramphenicol stabil in diesem Vollmedium. Für alle anderen Antibiotika wurde das halb konzentrierte MB (hMB) Medium verwendet. Kulturmaterial wurde steril aus Glycerinkonserven entnommen und auf einer MB bzw. hMB Platte ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30 °C für 3 Tage.

MB-Platte:	40 g/l	Marine-Bouillon
	18 g/l	Agar-Agar
hMB-Platte:	20 g/l	Marine-Bouillon
	18 g/l	Agar-Agar

3.5.3 Bakterienkultivierung in Flüssigkultur

E. coli Kulturen wurden in 100 ml Schikanekolben mit je 30 ml LB Medium und entsprechenden Antibiotika ausgehend von einer Plattenkultur bzw. aus einer Glycerinkonserven inokuliert und über Nacht (ü. N.) bei 37 °C und 200 rpm kultiviert.

LB-Medium:	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	Trypton
	10 g/l	NaCl

Für *D. shibae* Stämme wurden die Bakterien von einer MB oder hMB Platte steril entnommen und mit ausreichender Zellmasse in das gewünschte Nährmedium überführt. Das Inokulieren von einer Flüssigkultur aus Glycerinkonserven ist in diesem Fall nicht möglich. Die Kulturen wurden, falls nicht anders angegeben, in 30 ml Medium in 100 ml Schikanekolben bei 200 rpm und 30 °C für ca. 30 h inkubiert.

MB-Medium:	40 g/l	Marine-Bouillon
------------	--------	-----------------

hMB-Medium:	20 g/l	Marine-Bouillon
-------------	--------	-----------------

Um definierte Bedingungen für Wachstumsversuche zu schaffen wurde ein Minimal Medium verwendet. In diesem definierten Salzwasser Medium (SWM) konnte das Spurenelement Eisen bei Bedarf hinzugefügt werden.

SWM Basis	28,00 mM	Na ₂ SO ₄
	4,86 mM	NH ₄ Cl
	342,00 mM	NaCl
	14,80 mM	MgCl ₂ * 6 H ₂ O
	6,70 mM	KCl
	1,00 mM	CaCl ₂ * 2 H ₂ O
	1,47 mM	KH ₂ PO ₄

Alle Komponenten wurden für 1 L berechnet, in 788 ml Milli-Q H₂O gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt und anschließend autoklaviert.

10 x NaHCO ₃	22,60 mM	NaHCO ₃
-------------------------	----------	--------------------

Das Natriumcarbonat wurde in 1 L Milli-Q H₂O gelöst und autoklaviert.

10 x Succinat-Glucose	168,00 mM	Succinat (Bernsteinsäure)
Casaminoacid Lösung	178,00 mM	Glucose
	10,00 g/l	Casaminoacid

Alle Komponenten wurden in 1 L Milli-Q H₂O gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt und anschließend sterilfiltriert (Porendurchmesser: 2 µm).

100 x Vitamin Lösung	0,82 mM	Biotin
	16,25 mM	Nikotinsäure
	5,83 mM	4-Aminobenzoe Säure
	3,77 mM	Thiamin
	1,48 µM	Cyanocobalamin (Vitamin B12)

Alle Komponenten wurden in 100 ml Milli-Q H₂O gelöst und sterilfiltriert (Porendurchmesser: 2 µm).

500 x Spurenelemente	7,55 mM	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	6,50 ml	HCl, 25 %
	14,00 mM	Titriplex III (Na_2EDTA)

Die drei Komponenten wurden in etwas Milli-Q H_2O gelöst und der pH-Wertes auf 6,0 bis 6,5 mit NaOH eingestellt.

Anschließend erfolgte die Zugabe von:

0,49 mM	H_3BO_3
0,50 mM	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
0,80 mM	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
1,00 mM	$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
11,70 μM	$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
0,50 mM	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
0,15 mM	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Die Komponenten wurden auf 500 ml mit Milli-Q H_2O aufgefüllt und sterilfiltriert (Porendurchmesser: 2 μm)

Am Ende wurde das SWM Medium gerichtet. Hierzu wurden zu je 788 ml SWM Basis 100,0 ml NaHCO_3 (10 x), 100 ml Succinat-Glucose-Casaminoacid Lösung (10 x), 10,0 ml Vitamin Lösung (100 x) und 2,0 ml Spurenelemente (500 x) hinzugegeben. Für das SWM Medium ohne Eisen wurde eine zweite Spurenelement Lösung ohne die Zugabe von 15 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ angesetzt.

Für alle Experimente in SWM Medium +/- Fe wurden die Stämme zuerst von einer Plattenkultur in MB Medium angezogen und anschließend daraus eine Vorkultur in SWM Medium +/- Fe mit einer Start OD_{578} von 0,05 angeimpft. Aus dieser Vorkultur wurde dann die gewünschte Hauptkultur in SWM Medium +/- Fe mit einer Start OD_{578} von 0,05 inokuliert.

3.5.4 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und sterilfiltriert (Tabelle 8). Es wurden die unten aufgeführten Antibiotika mit folgenden Endkonzentrationen zu den autoklavierten, abgekühlten Medien hinzugegeben:

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration	Organismus
Ampicillin	100 mg/ml in Wasser	100 µg/ml	<i>E. coli</i>
Chloramphenicol	34 mg/ml in	34 µg/ml	<i>E. coli</i>
	70 % Ethanol	20 µg/ml	<i>D. shibae</i>
Gentamicin	100 mg/ml in Wasser	80 µg/ml	<i>D. shibae</i>
Kanamycin	50 mg/ml in Wasser	100 µg/ml	<i>D. shibae</i>
Tetracyclin	10 bzw. 80 mg/ml in 70 %	10 µg/ml	<i>E. coli</i>
	Ethanol	80 µg/ml	<i>D. shibae</i>

3.5.5 Anlegen von Glycerinkulturen

Um eine Bakterienkultur über längere Zeit zu lagern, wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurde für eine *E. coli* Glycerinkultur die Übernachtskultur einer Einzelkolonie in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angesetzt und bei 37 °C für 16 h bei 200 rpm schüttelnd inkubiert. Zu 700 µl Zellkultur wurden 300 µl 80 % (v/v) Glycerin gegeben und bei -80 °C gelagert. Für die Glycerinkultur einer *D. shibae* Kultur wurden 2-4 ml einer 30 h Kultur in MB Medium abzentrifugiert und das Pellet in 600 µl *D. shibae* Kultur resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl 80 % igen (v/v) Glycerin wurde die Glycerinkultur bei -80 °C gelagert.

LB-Medium	5,0 g/L	Hefeextrakt
	10,0 g/L	Pepton
	10,0 g/L	NaCl
MB Medium	40,0 g/L	Marine-Bouillon

3.5.6 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen.

3.6 Molekularbiologische Techniken

3.6.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen (RbCl-Methode)

Zur Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen (DH10B) wurden 2,5 ml Zellsuspension aus einer Übernachtskultur entnommen und in 250 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO₄ überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 4.000 rpm, für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Rotor SLA 3.000, Heraeus). Das Sediment wurde vorsichtig in 40 ml gekühltem TFB-I Puffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut für 20 min bei 4 °C und 4.000 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend in 4 ml TFB-II resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden letztlich zu je 200 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

TFB-I:	30 mM	Kaliumacetat
	10 mM	CaCl ₂
	50 mM	MnCl ₂
	100 mM	RbCl
	15 % (w/v)	Glycerin

Mit 1 M Essigsäure wurde der pH-Wert auf 5,8 eingestellt und sterilfiltriert.

TFB-II:	10 mM	PIPES pH 6,5
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	RbCl
	15 % (w/v)	Glycerin

Der pH-Wert wurde mit 1 M KOH auf pH 6,5 eingestellt und sterilfiltriert.

3.6.2 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen (CaCl₂-Methode)

Eine Vorkultur wurde in 5 ml LB-Medium und entsprechenden Antibiotika für 16 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Hauptkultur wurde 1:100 aus der Vorkultur in 100 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6-0,8 bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Kultur in zwei 50 ml Flacons überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zellernte bei 4.000 rpm und 4 °C für 10 min (Megafuge 1.0 R, Rotor SLA 3.000, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vorsichtig in 1 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ und 10 % Glycerin resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut bei

4.000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und erneut resuspendiert. Das gelöste Pellet wurde zu 45 µl aliquotiert bei -80 °C gelagert.

3.6.3 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen wurde 1 µl Plasmid-DNA bzw. 5 µl Ligationsansatz zu 45 µl chemokompetenter *E. coli*-Zellen gegeben. Dieser Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec unterzogen. Nach 2-minütigem Abkühlen auf Eis erfolgte die Zugabe von 500 µl LB-Medium. Der Transformationsansatz wurde für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert, bevor jeweils 250 µl auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert wurden. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C.

3.6.4 Konjugaler Gentransfer von Plasmid-DNA in *D. shibae*

Bei einem konjugalen Gentransfer wird neben einem Rezipientenstamm, der das Plasmid aufnimmt, auch ein Donorstamm, der das Plasmid überträgt, benötigt. Als Donorstamm für die Übertragung von Plasmiden in *D. shibae* diente der 5-Aminolävulinsäure (ALA) auxotrophe *E. coli* ST18 Stamm. Dieser ist in der Lage einen Pilus auszubilden um das Plasmid in den Rezipientenstamm von *D. shibae* zu transferieren. In dieser Arbeit wurden als Rezipientenstämme die *D. shibae* Stämme DFL12^T, Δfur , Δirr , $\Delta rirA$ und $\Delta iscR$ verwendet. Die Hauptkulturen wurden aus einer Vorkultur mit einer OD₅₇₈ von 0,05 inokuliert und anschließend wurden die Rezipientenstämme bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 in 30 ml hMB Medium und der Donorstamm in 30 ml LB Medium mit 50 µg/ml ALA kultiviert. Nachdem der *E. coli* ST18 die entsprechende OD erreicht hatte, musste zunächst das LB Medium durch mehrmaliges Waschen mit hMB Medium vollständig entfernt werden. Der Donorstamm wurde in einem Verhältnis von 1:5 zum Rezipientenstamm entnommen und in ein 15 ml Falcon überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die fünffache Menge an Rezipient hinzugegeben (Megafuge 1.0 R, Rotor SLA 3.000, Heraeus). Die Zellen wurden erneut für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen im Rückfluss resuspendiert. Nach diesem Schritt befand sich im Falcon eine Zellsuspension aus Rezipient und Donor. Im nächsten Schritt wurde ein Membranfilter mit Porengröße 0,2 µm auf eine hMB Agarplatte mit 50 µg/ml ALA gelegt und die Zellsuspension auf diesen Membranfilter pipettiert. Die Membran dient dabei zur Stabilisierung der Zellen, damit der empfindliche Pilus leichter gebildet und stabiler während dem Gentransfer vorliegt. Die Platten wurden für 1-3 Tage im Dunkeln inkubiert, da das in den Platten vorhandene ALA

lichtsensitiv ist. Nach der Inkubation wurde der Filter in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die Zellen mit 1 ml MB Medium von dem Filter gespült. Die Verwendung von MB Medium hat den Vorteil, dass der Salzgehalt in diesem Medium zu hoch für das Wachstum der *E. coli* ST 18 Zellen ist und diese dadurch leichter absterben. Zur vollständigen Trennung der Zellen und Unterbrechung des Gentransfers, wurden die Zellen gevortext. Im Anschluss wurden Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-7} erstellt und davon jeweils 100 µl auf hMB Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Inkubation der Ausstriche erfolgte für 3-7 Tage bei 30 °C.

3.6.5 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Feliciello und Chinali durchgeführt (Feliciello & Chinali, 1993). Hierfür wurde die *E. coli* Kultur, die das gewünschte Plasmid enthielt, in 8 ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotikazugabe angeimpft. Diese Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. 4 ml der Bakterienkultur wurden anschließend in einem sterilen 2 ml Reaktionsgefäß bei RT und 11.337 x g für 10 min sedimentiert (MiniSpin, Eppendorf) und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 300 µl Resuspensionspuffer mit 3 µl frischer RNase resuspendiert. Die RNase führt dazu, dass die RNA der Zellen abgebaut wird. Anschließend wurden 300 µl Lysis-Puffer II hinzugegeben und invertiert; dadurch wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach der Lyse wurden 300 µl Lysis-Puffer III zugegeben und erneut invertiert. Durch den sauren pH-Wert wurden zelluläre Proteine denaturiert. Der ausgefallene, weiße Niederschlag aus genomischer DNA, Proteinen und Membranfragmenten wurde durch Zentrifugation bei 4 °C und 11.337 x g für 20 min sedimentiert (Biofuge fresco, Heraeus). Der Überstand wurde ohne Kontamination mit dem weißen Niederschlag in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 600 µl 100 %igem Isopropanol. Der Ansatz wurde für 15 min bei RT und 11.337 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Plasmid-DNA bei 50 °C im Thermoschüttler getrocknet und in 50 µl dest H₂O resuspendiert.

Resuspensionspuffer:	50,00 mM	Tris-HCl pH 8,0
	10,00 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A

Lysis-Puffer II:	200,00 mM	NaOH
	1 % (w/v)	SDS

Lysis-Puffer III:	3,00 M	Kaliumacetat pH 5,5
-------------------	--------	---------------------

Alternativ wurde die Präparation von Plasmid DNA aus Bakterienzellen mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit vorgenommen und nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.6.6 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol – Extraktion und Ethanol Fällung

Um die Fällung der DNA zu verbessern wurden 1/10 Volumen einer 3 M Natrium-Acetat pH 4,8 Lösung hinzugegeben. Im Anschluss wurde zur DNA Lösung das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben und mit dem Vortexer vermischt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 11.337 x g wurde der wässrige Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das gleiche Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben. Das Gemisch wurde erneut gevortext, für 5 min bei 11.337 x g zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 2,5 Volumen eiskaltem 100 %igem Ethanol für 30 min bei -20 °C. Die DNA wurde durch eine Zentrifugation bei 11.337 x g für 5 min pelletiert, der Überstand verworfen und die DNA 2 x mit 500 µl 70 %igem (v/v) Ethanol für 15 min bei 50 °C gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die DNA für 10 min bei 11.337 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Trocknung der DNA erfolgte für 10 min bei 50 °C im Thermoblock. Anschließend wurde die DNA in 20 µl bis 50 µl sterilem H₂O gelöst, die Konzentration mittels Nanodrop Messung bestimmt und die DNA bei -20 °C gelagert.

3.6.7 Präparation genomischer DNA aus *D. shibae*

Für die Präparation von genomischer DNA aus *D. shibae* wurden 40 ml einer gut bewachsenen Kultur (ca. 30 h) in ein 50 ml Falcon überführt und bei 4.000 rpm für 15 min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Rotor SLA 3.000, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 564 µl TE Puffer resuspendiert und das gelöste Pellet wurde im Anschluss auf 2 sterile 2 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt. Um die RNA und Proteine zu zerstören wurden erst 6 µl RNase (10 mg/ml) und anschließend 10 µl Lysozym (10 mg/ml) Lösung hinzugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Zellen für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 6 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 30 µl 20 % SDS Lösung. Das Gemisch wurde vorsichtig invertiert und bis zum Verlust der Trübung

(ca. 60 min) bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl 5 M NaCl Lösung erfolgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 2 min. Die folgende Phenol-Chloroform Aufreinigung diente zur Reinigung der DNA, welche im Anschluss mit 100 % Isopropanol gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen wurde. Das trockene Pellet wurde in 200 µl TE Puffer sterilem dest. H₂O gelöst. Die Konzentration der gereinigten DNA wurde am Nanodrop gemessen. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei 4 °C.

TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA pH 8,0
Lysozym Lösung	10 mg/ml	Lysozym in dH ₂ O lösen
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml	Proteinase K in dH ₂ O lösen
RNase Lösung (DNase frei)	10 mg/ml	RNase A
	0,01 M	Natriumacetat pH 5,2
	1M	Tris HCl pH 8,0

3.6.8 DNA Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA. Als Template kann entweder Plasmid DNA, genomische DNA oder eine Bakterienkolonie verwendet werden. Die Menge der eingesetzten Template DNA variiert zwischen 5 ng und 100 ng. Wurde eine Kolonie als Template verwendet, wurde diese in 1/10 Volumen des Ansatzes in sterilem H₂O gelöst. Es folgte die Zugabe von 5-fach HF Puffer, der als 1-fach konzentrierter Puffer im Anschluss im Ansatz vorlag. Zusätzlich wurden 2,5 mM dNTPs und 100 pmol/µl der Primer hinzugegeben. Zum Schluss wurde die Phusion Polymerase (5 U/µl) hinzugegeben. Der Ansatz wurde entsprechend mit sterilem, dH₂O aufgefüllt und die PCR gestartet.

Das Standard Programm der PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Initiale Denaturierung	96 °C	5 min	
Denaturierung der ds DNA	96 °C	30 sec	}
Annealing der Primer	45 °C – 65 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec/ 1 kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	

Die Annealing Zeit variierte je nach Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Alternativ zu der Phusion Polymerase wurde auch die Q5-Polymerase (NEB) verwendet, die besonders bei GC reichen DNA Bereichen verwendet wurde. Zur Stabilisierung der Polymerase wurde teilweise 0,1 µl bis 0,5 µl MgCl₂ (50 mM) hinzugegeben bzw. 0,5 µl bis 1,5 µl DMSO (100 %) um die Amplifikation GC reicher Abschnitte zu verbessern.

3.6.9 Multiplex PCR

Um Deletionsmutanten zu kontrollieren wurde eine Multiplex PCR durchgeführt. Hierbei wurde nicht nur ein Zielfragment in einer Einzel-PCR amplifiziert sondern mehrere, durch die Verwendung mehrerer Primer, die jeweils aufeinander abgestimmt waren. Für die Kontrolle der Deletionsmutanten sollte zum einen der korrekte Einbau der Gentamicin Kasette und zum anderen die Deletion des *rirA* bzw. *iscR* Gens getestet werden. Hierzu wurden drei unterschiedliche Primer verwendet. Primer 1 bindet im upstream Bereich des Gens, Primer 2 in der Gentamicin Resistent Kasette und Primer 3 im Gen (Abb. 10). Bei einem doppel Crossover Ereignis und einer daraus resultierenden Deletionsmutante würde die Multiplex PCR nur eine Bande aufzeigen, die durch die gebundenen Primer 1 und 2 entstanden ist und den Einbau der Resistenzkasette zeigt. Bei einem single Crossover Ereignis würden 2 Banden in der PCR entstehen, durch das Primerpaar 1/2 eine Bande für die Resistenzkasette und durch das Primerpaar 1/3 eine für das verbliebene Gen.

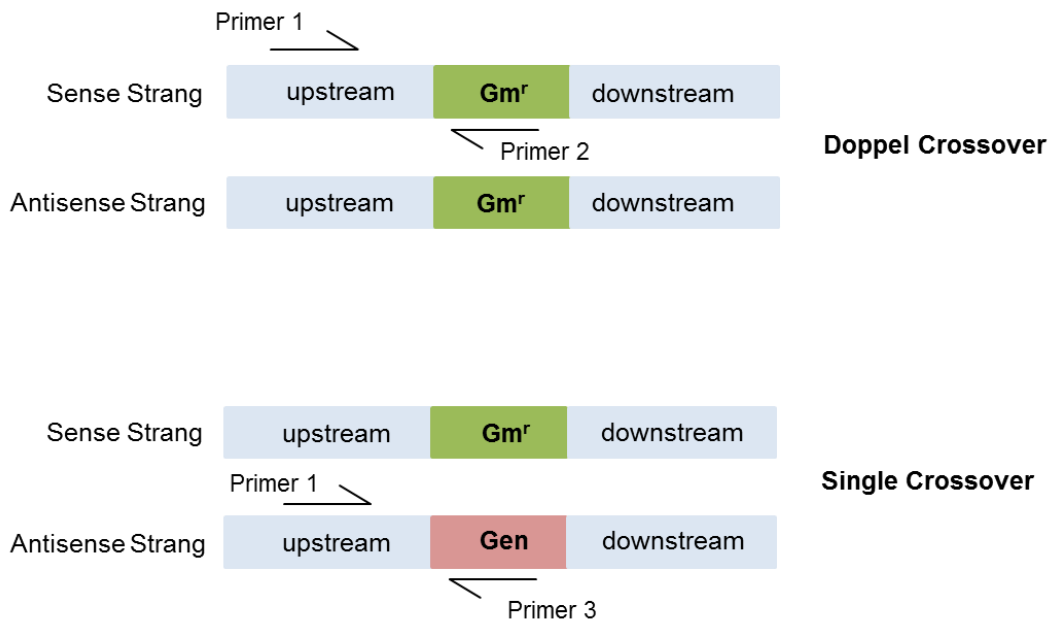


Abb. 10: Prinzip der Multiplex PCR zur Überprüfung von Doppelcrossover und Single Crossover Ereignissen. Der Sense und Antisense Strang ist jeweils angegeben. Im oberen Teil ist ein doppel Crossover Ereignis zu sehen und im unteren Teil ein single Crossover Ereignis. Die skizzierten Positionen der Primer sind durch Halbpfeile markiert und die Primer entsprechend beschriftet. Die Gentamicin Resistenzkassette ist grün markiert und das Zielgen rot.

Die Primerpaare für die Erstellung der *rirA* und *iscR* Deletionsmutanten sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Multiplex Primer für das jeweilige Zielgen

Gen für die Deletion	Primer 1	Primer 2	Primer 3	Fragmentgröße der Primerpaare
<i>rirA</i>	EH590	EH599	EH591	Primerpaar 1/2 = 490 bp
				Primerpaar 1/3 = 762 bp
<i>iscR</i>	EH631	EH599	EH632	Primerpaar 1/2 = 486 bp
				Primerpaar: 1/3 = 912 bp

3.6.10 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Das Spalten von Plasmid DNA und PCR Produkten erfolgte in 50 µl Ansätzen unter Verwendung von einer Restriktionsendonuklease (glatte Enden) oder zwei Restriktionsendonukleasen (Überhang Enden). Es wurden 3 U Enzym pro µg eingesetzter DNA verwendet und die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Die Restriktion erfolgte für 2 h bei 37 °C.

3.6.11 Aufreinigung von DNA Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden nach dem Restriktionsverdau unter Verwendung des Gelextraktions-Kits (Qiagen, Deutschland) aus einem 1 % Agarosegel extrahiert. Für die Extraktion von PCR amplifizierter DNA wurde das PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland) verwendet.

3.6.12 Dephosphorylierung der DNA Enden

Um das Reagieren von gespaltenen Vektoren zu verhindern, wurden diese an den geschnittenen Enden dephosphoryliert. Die 5'-Phosphatenden wurden mit 3 U der Calf Intestine Phosphatase (CIP) durch die Inkubation für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert. Die CIP konnte durch 15 minütiges Erhitzen bei 65 °C abgestoppt werden.

3.6.13 Ligation von DNA

Für die Ligation wurden 25 ng Vektor und 100 ng Insert in einem 10 µl Ansatz durch Zugabe von 1 U T4-DNA-Ligase, 1 µl 10-fach Puffer und entsprechenden Mengen sterilem dH₂O inkubiert. Die Ligation wurde bei 25 °C für 2 h oder bei 17 °C über Nacht durchgeführt. Die Ligase konnte durch Erhitzen auf 65 °C für 15 min inaktiviert werden.

3.6.14 Ligationsunabhängige Klonierung (Ligation independent cloning, LIC)

Bei der ligationsunabhängigen Klonierung wurde der Schritt der Ligation unter Verwendung einer Ligase durch einen Annealingschritt ersetzt. Hierzu wurden spezifische Überhang Enden für den Promotorbereich benötigt. Der forward Primer erhält eine 5'-CCGCGGGCTTTCCCAGC-3' Sequenz als Überhang und der reverse Primer eine 5'-G TTCCTCCTTCCCACC-3' Sequenz. Mit diesen Überhängen wird der gewünschte Promotor in einer PCR amplifiziert und mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

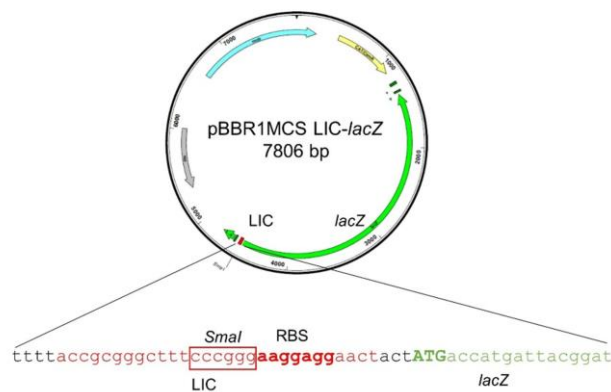


Abb. 11: Vektorübersicht für die ligationsunabhängige Klonierung. Für die Klonierungen wurde der Vektor pBBR1MCS LIC-lacZ verwendet. Die Chloramphenicol Resistenzkassette ist gelb markiert, die Mobilitäts-Gene (*mob*) blau und das lacZ Gen grün. Der Ausschnitt der LIC-Site zeigt die SmaI Schnittstelle (roter Kasten), die Ribosomenbindestelle (RBS, rot, hervorgehoben) und den Beginn des lacZ Gens (grün, hervorgehobenes ATG).

Als Vektor wurde das pBBR-1 *LIC*LacZ Plasmid verwendet (Abb. 11). Dieses wurde mit SmaI für 2 h bei 25 °C geschnitten, das Restriktionsenzym im Anschluss für 10 min bei 80 °C inaktiviert und der geschnittene Vektor durch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Aufreinigung von Enzymen und Puffer gereinigt. Die Konzentration von Insert und Vektor wurde mittels Nanodrop bestimmt. Vektor und Insert wurden getrennt voneinander mit der T4-Polymerase behandelt um die Überhangenden zu modifizieren (Abb. 12). Der Vektor erhielt Überhänge durch die Zugabe von dATPs und das Insert durch die Zugabe von dTTPs. Die genauen Mengen sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Übersicht der Ansätze für die T4 Behandlung

	Vektor (z.B. pBBR LIC-lacZ)	Insert (PCR Promotor)
Vektor SmaI gespalten + aufgereinigt	≈ 100ng	
Aufgereinigte PCR vom Insert		≈ 300ng
10x NEBPuffer 2	4 µl	4 µl
10mg/ml BSA	0,4 µl	0,4 µl
2,5 mM dATP's (für Vektor)	1 µl	
2,5 mM dTTP's (für Insert)		1 µl
Steriles Wasser	Auffüllen auf Gesamtvolumen	Auffüllen auf Gesamtvolumen
3U/µl T4 Polymerase (NEB)	2 µl	2 µl
Gesamtvolumen	40 µl	40 µl

Die Ansätze wurden in PCR Reaktionsgefäßen angesetzt und für 20 min bei 22 °C inkubiert, im Anschluss für 30 min bei 75 °C inkubiert und zum Schluss bis zur weiteren Verwendung bei 12 °C in der PCR Maschine gelagert. Für den folgenden Annealing Schritt wurden 2 µl Vektor mit 2 µl Insert für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in chemokompetente *E. coli* DH10B Zellen transformiert und auf LB Agar Platten mit 34 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert. Potentiell positive Klone wurden mittels Kolonie PCR kontrolliert und zur genauen Überprüfung sequenziert.

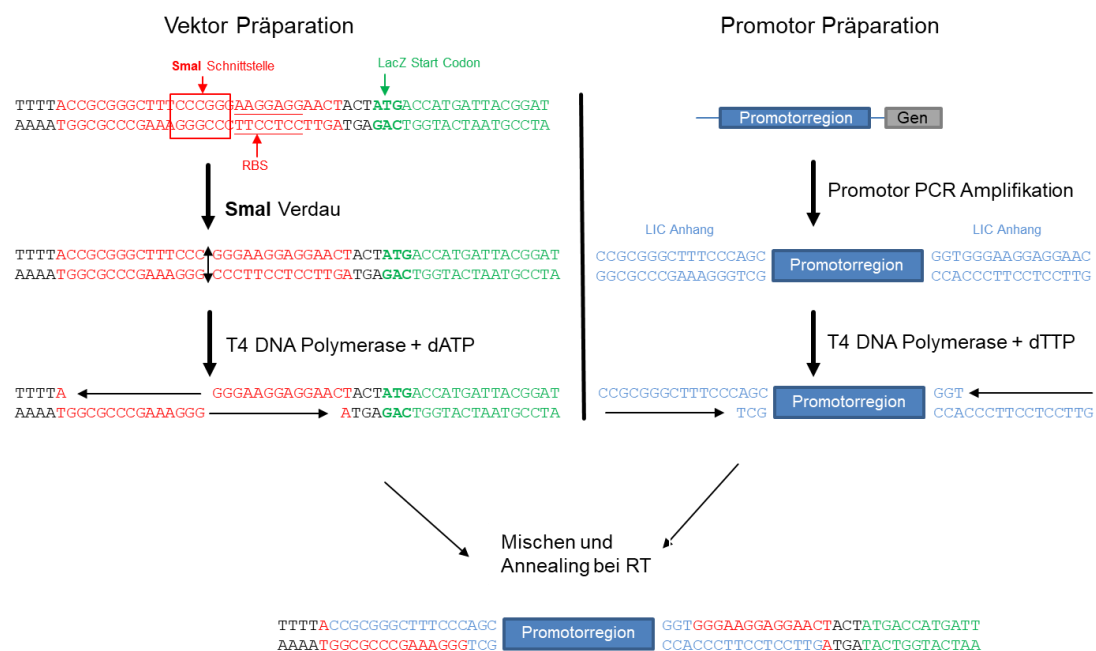


Abb. 12: Prinzip der LIC Klonierung. Die Präparation des Vektors ist in rot dargestellt und die Präparation des Promotorfragments in blau.

3.6.15 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde mittels des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (NEB) durchgeführt. Die für die Mutagenese benötigten Primer wurden speziell mit dem NEBaseChanger™ Tool designend. Für die ortsgerichtete Mutagenese muss das zu mutierende Gen in einem entsprechenden Vektor vorliegen. In dieser Arbeit wurde dafür der pET52b Vektor verwendet. Durch die Verwendung der Q5 Hot Start High Fidelity Polymerase wurde eine sehr geringe Fehlerrate erreicht. Die parentale DNA des Sense und Anti-Sense Stranges lag im Vergleich zur amplifizierten DNA methyliert vor und konnte

so durch die Zugabe des Enzyms DpnI selektiv verdaut werden. So verbleibt nur die mutierte Plasmid-DNA. Die Plasmide wurden in chemokompetente DH10B Zellen transformiert und im Anschluss sequenziert.

3.6.16 DNA-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 %ige bzw. 2 %ige Agarosegele verwendet. Die mit einem sechsfachen Ladepuffer versehenen DNA-Proben wurden auf das Gel aufgetragen und mit einer Spannung von 90-140 V aufgetrennt. Als Größenstandard diente der Quick Load Purple 2-Log Ladder (New England Biolabs). Nach dem Lauf wurden die Banden mit Ethidiumbromid gefärbt. Durch die Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 312 \text{ nm}$ konnten DNA-haltige Bereiche sichtbar gemacht werden.

Die entstandenen Banden wurden dann über eine Geldokumentationsanlage (GelDoc) visualisiert und digitalisiert.

TAE-Puffer:	40 mM	Tris-Acetat
	1 mM	EDTA
Agarosegel:	1 % (w/v)	Agarose in TAE-Puffer
Ethidiumbromid:	0,1 % (w/v)	Ethidiumbromid in Wasser
6x Probenpuffer:	350,00 μM	Bromphenolblau
	450,00 μM	Xylen Cyanol FF
	0,25 %	Orange G
	(w/v)	Saccharose
	115,00 μM	

3.6.17 Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem NanoDrop-Gerät durch Messen der Extinktion bei 260 nm. Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, bzw. 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und 280 nm zeigte den Grad der Reinheit der Lösung. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

3.6.18 Konstruktion von Plasmiden zur Herstellung von Deletionsmutanten in *D. shibae*

Für die Deletion der Gene *rirA* (*Dshi_1660*) und *iscR* (*Dshi_1633*) wurde eine Gentamicin Resistenz Kasette zwischen den up-und downstream Bereich des jeweiligen Gens kloniert und diese durch doppelte homologe Rekombination in das Genom von *D. shibae* eingefügt. Für die Amplifikation des 1289 bp langen *rirA* upstream Bereichs wurde das Primerpaar EH611/EH612 und für den 1813 bp langen downstream Bereich das Primerpaar EH615/ EH616. Die Gentamicin Resistenz Kasette (872 bp) für die Konstruktion der Deletionsmutante von *rirA* wurde mit den Primern EH613/ EH614 aus dem Vektor pBBR1-MCS-5 amplifiziert. Nach dem Restriktionsverdau aller Fragmente, folgte die Ligation dieser Fragmente mit einem resultierenden Gesamtfragment von 3948 bp Länge. Dieses wurde im Anschluss mit den Primer EH611 und EH616 amplifiziert und in den suicide Vektor pEX18Tc über die Schnittstellen HindIII und KpnI kloniert. Dies resultierte im Plasmid pEX18Tc Δ *rirA*. Analog wurde für die Konstruktion einer Deletionsmutante von *iscR* verfahren. Mit dem Primerpaar EH619/ EH620 wurde der 1133 bp upstream Bereich des *iscR* Gens amplifiziert. Die Primer EH621 und EH622 dienten der Amplifikation der 861 bp Gentamicin Resistenz Kasette und das Primerpaar EH623/ EH624 wurde zur Amplifikation des 1094 bp downstream Bereichs des *iscR* Gens verwendet. Nach einem Restriktionsverdau aller Fragmente und der anschließenden Ligation, wurde das Gesamtfragment mit einer Länge von 3088 bp mit den Primern EH619 und EH 624 amplifiziert. Über die Schnittstellen SphI-HF und SacI-HF wurde das Fragment in den suicide Vektor pEX18Tc kloniert und resultierte im Plasmid pEX18TC Δ *iscR*. Die Plasmide wurden in den DH10B Zellen transformiert und sequenziert. Für den konjugalen Gentransfer wurden die sequenzierten Plasmide in den ALA auxotrophen *E. coli* Stamm ST18 transformiert und anschließend in den *D. shibae* DFL12^T Wildtypstamm eingebracht. Mittels einer Multiplex PCR wurden die Stämme auf Richtigkeit überprüft.

3.6.19 Konstruktion von Plasmiden zur Komplementation

Für die Komplementation der Deletionsmutanten Δ *rirA* und Δ *iscR* sowie für die Transposonmutanten Δ *fur* und Δ *irr* wurde der Vektor pRhokS verwendet. Dieser besitzt eine Chloramphenicol Resistenz und die Möglichkeit Gene hinter einen konstitutiven *aphII* Promotor mit einem C-terminalem Strep-Tag zu klonieren. Für die Komplementation der Δ *fur* Mutante wurde das *fur* Gen mit dem Primerpaar EH715/ EH716 mit eigenem Stopp

Codon amplifiziert und über die Schnittstellen NdeI und XhoI in den pRhokS Vektor kloniert. Das *irr* Gen wurde mit den Primern EH717 und EH718 und das *iscR* Gen mit den Primern EH719 und EH720 mit Stopp Codon amplifiziert und ebenfalls über die Schnittstellen NdeI und XhoI in den Vektor kloniert. So entstanden die Plasmide pRhokS-*fur*, pRhokS-*irr* und pRhokS-*iscR*. Für die Komplementation der $\Delta rirA$ Mutante wurden zwei verschiedenen Plasmide konstruiert. Über das Primerpaar EH641/ EH642 wurde das *rirA* Gen mit N-terminalem StrepII-Tag und Stopp-Codon aus dem Plasmid pET52*rirA* amplifiziert und hinter den konstitutiven *aphII* Promoter über die Schnittstellen NdeI und PstI in den pRhokS Vektor kloniert. Hieraus resultierte das Plasmid pRhokS-*aphII*-StrepII-*rirA*. Für das andere Plasmid zur Komplementation von $\Delta rirA$ wurde das *rirA* Gen mit nativem Promoter und ohne Stopp Codon aus genomischer DNA mit dem Primerpaar EH639/ EH644 amplifiziert. Über die Schnittstellen SacI und PstI wurde das Fragment in den pRhokS Vektor kloniert und das resultierende Plasmid pRhokS-*rirA*StrepII wies einen nativen Promoter und einen C-terminalen Strep-Tag auf. Alle Plasmide zur Komplementation wurden in DH10B Zellen transformiert, sequenziert und für den konjugalen Gentransfer in die Deletions- bzw. Transposonmutanten in *E. coli* ST18 Zellen transformiert.

3.6.20 Konstruktion von Plasmiden zur Produktion von RirA und Mutanten in *E. coli*

Für die Klonierung des *rirA* Gens aus *D. shibae* in den StrepII-Tag Fusionsvektor pET52b(+) (Novagen, Merck, Deutschland) wurde das *rirA* Gen aus genomischer DNA mit dem Primerpaar EH568/ EH569 amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen XmaI und SacI-HF verdaut. Das Fragment wurde in den ebenfalls gespaltenen Vektor ligiert und es resultierte das Plasmid pET52b(+)*rirA* für die rekombinante Produktion von RirA mit einem N-terminalem StrepII-Tag (StrepII-RirA). Als Produktionsstamm wurden *E. coli* BL21CD+(DE3)RIL Zellen verwendet. Um den Einbau des Fe-S Kofaktors zu verbessern, wurde neben dem pET52b(+)*rirA* Plasmid für die rekombinante Produktion von RirA noch ein zusätzliches Plasmid für die Biogenese von Fe-S Cluster transformiert. Hierfür wurden zwei Plasmide verwendet. Zum einen das Plasmid pRKSUF017 (Takahashi & Tokumoto, 2002), welches eine Tetracyclin Resistenz aufweist und das gesamte SUF Operon von *E. coli* konstitutiv reguliert und zum anderen das pRKISC Plasmid (Takahashi & Nakamura, 1999), welches das gesamte ISC Operon von *E. coli* exprimiert und ebenfalls eine Tetracyclin Resistenz besitzt.

Für die Konstruktion der einzelnen Cysteinaustauschmutanten wurde der Vektor pET52b(+)*rirA* als Matrize verwendet und mittels der ortsgerichteten Mutagenese die Plasmide pET52b(+)*rirAC17A* mit dem Primerpaar MB11/ MB12, pET52b(+)*rirAC91A* mit dem Primerpaar MB13/ MB14, pET52b(+)*rirAC99A* mit dem Primerpaar MB09/ MB10 und pET52b(+)*rirAC105A* mit dem Primerpaar MB15/ MB16 erstellt. Der Genabschnitt, in dem enthaltenen Cysteine gegen Alanine ausgetauscht worden sind, wurde synthetisch von der Firma Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) synthetisiert und im Vektor pMA-T vorliegend verschickt. Über die Schnittstellen XmaI und SacI-HF wurde die Gensequenz aus dem Vektor geschnitten und in den pET52b(+) Vektor ligiert. In dem resultierenden Plasmid pET52b(+)*rirA5Cmut* wurden die Cysteine an den Positionen 17, 91, 97, 99 und 105 gegen Alanine ausgetauscht.

3.6.21 Konstruktion von Plasmiden zur Produktion von IscR und Mutanten in *E. coli*

Das *iscR* Gen aus *D. shibae* wurde mit den Primern EH585 und EH586 aus genomischer DNA amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen SacI-HF und XmaI gespalten. Der Vektor pET52b(+) wurde ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen gespalten und das Genfragment in den Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid pET52b(+)*iscR* wurde für die rekombinante Produktion von IscR mit einem N-terminalen StrepII-Tag verwendet (StrepII-IscR). Für die rekombinante Produktion von IscR wurde der *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)RIL verwendet. Um die Aufnahme von Hämin in die *E. coli* Zellen zu verbessern, wurde zusätzlich zum Plasmid pET52b(+)*iscR* das Plasmid pHPEX3-Kan mit einer Kanamycin Resistenz und einem konstitutiv exprimierten Hämin Aufnahmesystem in die Zellen transformiert (Varnado & Goodwin, 2004).

Die Plasmide für die Austausch Mutanten wurden der Masterarbeit von Kim Rennhack entnommen. Hier wurde das Cystein an Position 140 durch ein Alanin ersetzt ebenso wie das Prolin an Position 141. Die Doppelmutante C140A/P141A wurde ebenfalls im Zuge der Masterarbeit von Kim Rennhack erstellt (Rennhack, TU Braunschweig, 2017).

3.6.22 Herstellung von *D. shibae* Stämmen zum Test von Reporterfusionen

Für die Herstellung von Reporterfusionen in *D. shibae* wurde der Vektor pBBR1MCSLIC-*LacZ* verwendet, welcher eine Chloramphenicol Resistenz Kassette besitzt. Mit Hilfe des Vektors war es möglich amplifizierte Promotorbereiche mit speziellen LIC-Überhängen über eine ligationsunabhängige Klonierung in den Vektor zu bringen.

Auf diesem Wege wurden die Plasmide pBBR10575_480bp-LacZ, pBBR10575_150bp-LacZ, pBBR1irpA-LacZ, pBBR1hemB2 LacZ, pBBR1iscR195bp-LacZ, pBBR1exbB-LacZ, pBBR1iscRmut1-LacZ, pBBR1iscRmut2-LacZ, pBBR1iscRmut3-LacZ, pBBR1napF-LacZ, pBBR1hmp-LacZ und pBBR1ctrA-LacZ erstellt. Die Plasmide wurden in *E. coli* ST18 Zellen transformiert, auf ihre Chloramphenicol Resistenz untersucht, mittels einer PCR kontrolliert und *via* konjugalem Gentransfer in verschiedene *D. shibae* Stämme übertragen. Nach der Aufnahme des Plasmids wurden die *D. shibae* Stämme auf ihre neue Chloramphenicol Resistenz getestet. Dabei wurden Chloramphenicol Mengen von 10 µg/ml bis 20 µg/ml verwendet, da einige positive Stämme nur eine sehr schwache Resistenz ausbildeten. Chloramphenicol resistente Klone wurden mit den Primern EH636 und T7 Prom auf den korrekten Einbau der Promotorregion untersucht. Der Primer T7 Prom bindet in der Vektorregion vor der LIC Position und der Primer EH636 in der *LacZ*-Region hinter dem eingebrachten Promotorfragment. Ohne Promotorfragment amplifiziert das Primerpaar EH636/T7Prom ein Fragment mit der Größe von 195 bp. Nach Insertion des Promotorbereichs vergrößert sich das amplifizierte Fragment entsprechend der eingefügten Promotorgröße.

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Promotoren und der dazugehörigen Primerpaare

Promotorfragment des Zielgens	Größe	Primer 1	Primer 2
<i>hemB2</i>	155 bp	EH695	EH696
<i>iscR</i>	195 bp		
<i>irpA</i>	491 bp	EH579	EH580
<i>Dshi_0575</i>	480 bp	EH577	EH578
<i>exbB</i>	472 bp	EH575	EH576
<i>napF</i>	176 bp	EH656	EH657
<i>hmp</i>	180 bp	EH721	EH722
<i>ctrA</i>	344 bp	EH687	EH688
<i>Dshi_0575</i>	150 bp	EH578	MB41

3.6.23 Anaerobisieren von Lösungen

Die für anaerobe Arbeiten verwendeten Lösungen und Puffer wurden zuvor anaerobisiert. Dazu wurde ein Gasaustausch gegen Stickstoff vorgenommen. Das gewünschte Volumen an Puffer oder Lösung wurde für 2-6 h je nach Volumen im 2-minütigen Wechsel Vakuum und Stickstoffbegasung (1 bar) ausgesetzt. Die Puffer und Lösungen befanden sich in Anaerobenflaschen mit Septum.

3.6.24 RNA Präparation

RNA Ernte

Für die RNA Isolierung wurden alle benötigten Utensilien sofern möglich 2 x autoklaviert und alle weiteren Gegenstände alternativ mit RNase Away (Qiagen) gereinigt. Um die Zellen zu ernten, wurden 4 ml RNA Protect (Qiagen) in 15 ml Falcons vorgelegt und im Anschluss 2 ml Probe mit einer OD₅₇₈ von 0,5 hinzu gegeben und für 30 s gevortext. Nach einer 5 minütigen Inkubation wurden die Zellen für 10 min bei 4.000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und Flüssigkeitsrückstände durch aufklopfen auf ein Papiertuch entfernt (Megafuge 1.0 R, Rotor SLA 3.000, Heraeus). Das Pellet wurde in 1 ml RNase freiem Wasser resuspendiert, für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet anschließend in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C bis zu vier Wochen.

RNA Aufreinigung

Die RNA Aufreinigung wurde mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Für den DNaseI Verdau wurde ebenfalls das RNase-Free DNase Set der Firma Qiagen verwendet. Durch Zugabe von Mix 1 bestehend aus 10 µl DNase Lösung und 70 µl RDD Puffer wurde der erste DNase Verdau gestartet. Für den zweiten DNase Verdau wurde der Mix 2 aus 2,5 µl DNase Lösung und 10 µl RDD Puffer hergestellt. Die Lösungen für Mix 1 und Mix 2 können bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Das RNA Pellet wurde in 200 µL TE-Puffer, in dem 15 mg/mL Lysozym gelöst worden sind, resuspendiert, 30 min bei RT inkubiert und alle 2 min für 10 sec gevortext. Nach der Inkubation wurden 700 µl RLT Puffer (Komponente des Kits) und eine Spatelspitze Glass Beads (Durchmesser: 40-70 µm) hinzugegeben und anschließend für 3 min auf dem Vortexer gut durchmischt. Nach der Zentrifugation bei 10.000 rpm für 3 min wurden 850 µl des Überstandes in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt, 470 µl 100 % EtOH

hinzugegeben und durch pipettieren gemischt. Im Anschluss wurden 700 µl der Probe auf eine RNeasy Mini Spin Säule gegeben, für 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, der Rest der Probe auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Für den ersten DNaseI Verdau werden 350 µl RW1 Puffer (Komponente des Kits) auf die Säule gegeben, 5 min inkubiert und für 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend folgte der Verdau mit DNaseI auf der Säule durch die Zugabe von 80 µl DNase Mix 1 und einer anschließenden Inkubation für 15 min bei RT. Nach der Inkubation wurden erneut 350 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben, 5 Min inkubiert, für 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss folgten zwei Waschschrte mit je 500 µl RPE Puffer (Komponente des Kits). Nach dem ersten Waschschrte folgte ein Zentrifugationsschrte bei 10.000 rpm für 30 sec und nach dem zweiten Wachschrte ein Zentrifugationsschrte für 2 min. Um die restliche Flüssigkeit zu entfernen, wurde die Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführt und erneut für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 45 µl H₂O und einer Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm. Um die Menge an verbliebener DNA in der RNA Probe zu ermitteln, wurden 2 µl des Eluats für eine NanoDrop Messung entnommen und vermessen. Ist noch restliche DNA in der Probe enthalten, wurde ein zweiter DNase Verdau durchgeführt. Hierfür wurden 12,5 µl des DNaseI Mix 2 zu 88 µl des RNA Eluats gegeben, vorsichtig durch pipettieren gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 350 µl RLT Puffer und anschließend die Zugabe von 250 µl 100 % EtOH mit jeweiligem Mischen durch invertieren. 700 µl der Probe wurden auf eine neue Mini Spin Säule gegeben, für 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es folgten erneut zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE Puffer. Nach dem ersten Waschschrte folgte ein Zentrifugationsschrte bei 10.000 rpm für 30 sec und nach dem zweiten Wachschrte ein Zentrifugationsschrte für 2 min. Die Säule wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert um Restflüssigkeit zu entfernen. Für die Elution wurde die Säule in ein Elutionsgefäß überführt und die RNA mit 2 x 25 µl H₂O durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm eluiert. Für die Bestimmung der RNA Menge wurden 2 µl des Eluats für eine NanoDrop Messung abgenommen und für die Bestimmung der Qualität der RNA ebenfalls 2 µl für eine Bioanalyzer Analyse.

RNA Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer Analysen

Die Qualitätskontrolle und der Test auf Degradation der RNA erfolgten mit dem Bioanalyzer System Agilent 2100 der Firma Agilent. Für die Analyse wurde ein Small RNA Chip der Firma Agilent sowie das Agilent RNA 6000 Nano Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben mit einer RNA Menge zwischen 5 ng und 500 ng.

TE-Puffer	10,0 mM	Tris-HCl pH 8,0
	1,0 mM	EDTA pH 8,0
DNase Mix 1	10,0 µl	DNaseI Lösung
	70,0 µl	RDD Puffer
DNase Mix 2	2,5 µl	DNaseI Lösung
	10,0 µl	RDD Puffer

3.6.25 Einfarben Microarray Analyse

Labeln der RNA

Für das Labeling der RNA wurde das USL Fluorescent Labeling Kit für Agilent Array der Firma KREATECH verwendet. Es wurde 1 µg RNA auf ein Gesamtvolumen von 17 µl mit H₂O aufgefüllt. Zu der Probe wurden anschließend 2 µl 10 x Labeling Lösung und 1 µl Cy-USL labeling reagent (Cy3) hinzugegeben, sodass das Endvolumen 20 µl entsprach. Die Probe wurde für 15 min bei 85 °C im Thermoblock erhitzt. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der KREApure Säulen. Das Säulenmaterial wurde durch vortexen resuspendiert, der Verschluss am unteren Teil der Säule entfernt, der Deckel eine viertel Drehung geöffnet, die Säule in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 11.337 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule durch Zugabe von 300 µl H₂O und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 11.337 x g äquilibriert. Die vorbereitete Säule wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die RNA Proben wurden nach dem Erhitzen auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Die gesamte RNA Probe wurde auf die Säule gegeben und für 1 min bei 11.337 x g abzentrifugiert. Zur Bestimmung der Konzentration bzw. der Farbstoffeinbaurate wurde der NanoDrop und das Protokoll RNA-40 genutzt.

Der DOL Wert (degree of labeling) sollte idealerweise zwischen 1,0 und 3,6 liegen. Der DOL wird mit Hilfe folgender Formel errechnet:

$$DOL [\%] = 340 * pmol_{dye} * 100 \% * ng_{RNA}^{-1} * 1000^{-1}$$

Fragmentierung der gelabelten RNA

Für die Fragmentierung der RNA wurde das Agilent Fragmentierungskit verwendet. In einem PCR Reaktionsgefäß wurden 300 ng der gelabelten RNA mit 5 µl 10 x blocking agent gemischt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 24 µl aufgefüllt. Nach dem die Proben kurz anzentrifugiert worden sind, erfolgte die Fragmentierung. Hierzu wurde der Deckel eines Thermocyclers auf 70 °C und der Block auf 60 °C vorgeheizt. Im Abstand von 30 sec wurde je 1 µl des 25-fachen Fragmentierungspuffers hinzugegeben, gut mit der Pipette durchmischt und für je genau 30 min in den Thermocycler gestellt. Nach der Inkubation im Thermoblock erfolgte sofort die Zugabe von 25 µl des 2 x Hybridisierungspuffers HI-RPM und anschließendem Mischen ohne die Entstehung von Luftblasen. Die Proben wurden bis sie abgekühlt waren auf Eis gelagert, dann für 1 min zentrifugiert und anschließend wieder auf Eis gelagert.

Beladen der Microarrays

Für das Beladen der Array Slides wurden die 8er Gasket Slides mit dem Gitter nach oben in ein Hybridisierungsgestell gelegt und 40 µl der Probe luftblasenfrei mittig in eine Kammer des Gasket Slides aufgetragen. Im Anschluss wurde der Microarray mit der „Agilent“-markierten Seite auf die „Agilent“-markierte Seite des Gasket Slides gelegt, vorsichtig der Deckel auf das Gestell gesetzt und mit Klammern verschlossen. Der Microarray Slide wurde für die Hybridisierung für 17 h bei 65 °C und 10 rpm inkubiert.

Waschen des Microarray Slides

Für das Waschen des Microarray Slides wurden die speziellen Waschpuffer der Firma Agilent verwendet und bei Bedarf nach Herstellerangaben mit Zusätzen versehen. Die Waschschalen 1 und 2 wurden jeweils mit dem Agilent Waschpuffer 1 und die Waschschale 3 mit dem Agilent Waschpuffer 2 ca. bis zu einer Höhe von 5 cm befüllt und mit einem Rührkern versehen. Die Waschschale 3 mit Waschpuffer 2 wurde auf 37 °C erwärmt. Durch Rühren bei 300 rpm wurden störende Luftblasen entfernt. Für das Waschen

wurde der Microarray zusammen mit dem Gasket Slide vorsichtig aus dem Hybridisierungsgestell genommen, in Waschschale 1 überführt und vorsichtig mit einer Pinzette der Microarray vom Gasket Slide entfernt. Der Microarray wurde anschließend in ein Waschgestell überführt und in Waschschale 2 gestellt. Das Waschgestell wurde aus der Waschschale 2 in die Waschschale 3 überführt, wobei Flüssigkeitsrückstände durch leichtes seitliches Kippen entfernt wurden. Der Waschschrift in Waschschale 3 erfolgte für 1 min. Der trockene Array Slide wurde mit der aktiven „Agilent“-markierten Seite nach oben in das Plastikgestell für den Array Scanner eingespannt und der Ozon barrier Slide aufgelegt. Das Auslesen des Array Slides erfolgte im Agilent Microarray Scanner und die Auswertung der Rohdaten mit der Programmiersprache „R“.

3.6.26 RNA Sequenzierung

Die RNA Sequenzierung wurde in Kooperation mit dem G2L (Goettingen genomics Laboratory) durchgeführt. Hierfür wurde die RNA des *D. shibae* DFL12^T Stamms verwendet. Die Kultur wurde in SWM Medium +/- Zugabe von 15 μ M FeSO₄ bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 kultiviert, die Zellen geerntet, die RNA präpariert und mittels Bioanalyzer auf Reinheit überprüft. Die Sequenzierung der RNA erfolgte in Göttingen. Unter Verwendung des Ribo-Zero rRNA Removal Kits (Illumina, San Diego, USA) wurde die ribosomale RNA entfernt. Strang spezifische RNA-Seq Bibliotheken wurden mit Hilfe des NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs) generiert. Für die Sequenzierung im MiSeq Instrument wurde das MiSeq Reagent Kit v3 (150 Zyklen) (Illumina, San Diego, USA) verwendet.

3.7 Biochemische Techniken

3.7.1 Heterologe Proteinproduktion und Reinigung von *D. shibae* RirA

Der RirA Regulator aus *D. shibae* wurde als Fusionsprotein mit einem StrepII-Affinitätstag gereinigt. Durch die Verwendung des Expressionsvektors pET52b (Novagen, Deutschland) ist die Expression durch einen T7-Promotor reguliert. Die Produktion erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL (Stratagene, LA Jolla, USA) mit dem zusätzlichen Plasmid pRKSUF017, um den vollständigen Aufbau und Einbau von Fe-S Clustern zu gewährleisten. Es wurden 500 ml LB-Medium mit entsprechenden Mengen Ampicillin, Chloramphenicol und Tetracyclin versetzt und zusätzlich 1 mM Eisen-(III)-Citrat und 10 mM Natriumnitrat hinzugegeben. Das gerichtete Medium wurde mit einer Start-OD₅₇₈ von 0,05 einer Übernachtskultur inokuliert

und bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Beim Erreichen einer Zelldichte zwischen OD₅₇₈ von 0,6 bis 0,8 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 100 µM IPTG-Lösung induziert. Nach der Induktion erfolgte die Kultivierung über Nacht bei 25 °C und 180 rpm. Zur Rekonstitution des Fe-S Zentrums wurde die Zellsuspension in Zentrifugenbecher mit O-Ring überführt, anschließend in das Anaerobenzelt bei 17 °C eingeschleust und für 2 h anaerobisiert. Im Anschluss wurden die Zentrifugenbecher luftdicht verschlossen und die Zellsuspension für 20 min bei 4 °C und 3.000 x g zentrifugiert (Beckmann Coulter).

Alle folgenden Schritte wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Das Zellsediment wurde in 15 ml Waschpuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde mit Hilfe einer French Press (19'200 p.s.i.) durchgeführt und die aufgeschlossenen Zellen in eine mit Stickstoff gefüllte und mit einem Septum verschlossene Transfusionsflasche aufgenommen. Um ungewollte DNA Fragmente zu zerstören, wurde der Zellaufschluss mittels French Press wiederholt. Zur Entfernung von Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen wurde der Zellextrakt bei 40.000 rpm und 4 °C für 65 min abzentrifugiert (Ultrazentrifuge L-90K, Beckman Coulter). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und für 10 min mit 200 µl einer 2 mg/ml Avidinlösung inkubiert. Das Avidin bindet das *E. coli* eigene Strep-Protein und verbessert so die Bindung des Fusionsproteins an die Säule. Der Überstand wurde anschließend auf vier Strep-Tactin Säulen mit jeweils 2 ml Strep-Tactin High capacity Säulenmaterial (IBA, Göttingen, Deutschland) aufgetragen, die zuvor mit 5 Säulenvolumen (SV) Waschpuffer äquilibriert worden waren. Der Durchfluss der Proteinlösung wurde separat aufgefangen und erneut auf die Säulen gegeben. Anschließend folgte ein Reinigungsschritt mit 5 SV Waschpuffer, um ungebundenes Protein und Rückstände zu entfernen. Für die Elution wurden die Säulen mit jeweils 2 ml d-Desthiobiotin haltigen Elutionspuffer beladen. Das d-Desthiobiotin hat eine höhere Affinität zum Säulenmaterial und verdrängt dadurch das mit dem StrepII-Tag gebundenen RirA Protein. Nach 30 minütiger Inkubation auf der Säule erfolgte die erste Elution. Es folgten drei weitere Elutionsschritte mit jeweils 2 ml Elutionspuffer und einer Inkubationszeit von 15 min. Das Fusionsprotein wurde mittels SDS-Gelelektrophorese auf seine Reinheit überprüft.

Waschpuffer:	100,0 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	150,0 mM	NaCl
	5,0 mM	DTT
Elutionspuffer:	100,0 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	150,0 mM	NaCl
	2,5 mM	d-Desthiobiotin
	5,0 mM	DTT

3.7.2 Heterologe Proteinproduktion und Reinigung von *D. shibae* IscR

Der IscR Regulator aus *D. shibae* wurde als Fusionsprotein mit einem StrepII-Affinitätstag gereinigt. Durch die Verwendung des Expressionsvektors pET52b (Novagen, Deutschland) ist die Expression durch einen T7-Promotor reguliert. Die Produktion erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL (Stratagene, LA Jolla, USA) mit dem zusätzlichen Plasmid pHPEX3-Kan, für eine verbesserte Häm Aufnahme der *E. coli* Zellen. Es wurden 500 ml LB-Medium mit entsprechenden Mengen Ampicillin, Chloramphenicol und Kanamycin versetzt. Das gerichtete Medium wurde mit einer Start-OD₅₇₈ von 0,05 einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Beim Erreichen einer Zelldichte zwischen OD₅₇₈ von 0,6 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 100 µM IPTG-Lösung induziert. Zusätzlich wurden 10 µM Hämin (H9039, Sigma) Lösung (50 mM in DMSO) hinzugegeben. Nach der Induktion erfolgte die Kultivierung über Nacht bei 25 °C und 180 rpm. Die Zellen wurden in Zentrifugenbecher mit O-Ring überführt, anschließend in das Anaerobenzelt bei 17 °C eingeschleust und für 2 h anaerobisiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 20 min bei 4 °C und 3.000 x g zentrifugiert (Beckmann Coulter).

Alle folgenden Schritte wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Das Zellsediment wurde in 10 ml Waschpuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde mit Hilfe einer French Press (19'200 p.s.i.) durchgeführt und die aufgeschlossenen Zellen in eine mit Stickstoff gefüllte und mit einem Septum verschlossene Transfusionsflasche aufgenommen. Um ungewollte DNA Fragmente zu zerstören, wurde der Zellaufschluss mittels French Press wiederholt. Zur Entfernung von Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen wurde der Zellextrakt bei 40.000 rpm und 4 °C für 65 min zentrifugiert (Ultrazentrifuge L-90K, Beckman Coulter). Anschließend wurde der Überstand

abgenommen und für 10 min mit 200 µl einer 2 mg/ml Avidinlösung inkubiert. Das Avidin bindet das *E. coli* eigene Strep-Protein und verbessert so die Bindung des Fusionsproteins an die Säule. Der Überstand wurde anschließend auf zwei High capacity Strep-Tactin Säulen mit jeweils 2 ml SV (IBA, Göttingen, Deutschland) gegeben, die zuvor mit 5 SV Waschpuffer äquilibriert wurden. Der Durchfluss der Proteinlösung wurde separat aufgefangen und erneut auf die Säulen gegeben. Anschließend folgte ein Reinigungsschritt mit 5 SV Waschpuffer, um ungebundenes Protein und Rückstände zu entfernen. Für die Elution wurden die Säulen mit jeweils 2 ml d-Desthiobiotin haltigem Elutionspuffer beladen. Das d-Desthiobiotin hat eine höhere Affinität zum Säulenmaterial und verdrängt dadurch das mit dem StrepII-Tag gebundene IscR Protein. Nach 30 minütiger Inkubation auf der Säule, erfolgte die erste Elution. Es folgten drei weitere Elutionsschritte mit jeweils 2 ml Elutionspuffer und einer Inkubationszeit von 15 min. Das Fusionsprotein wurde mittels SDS-Gelelektrophorese auf seine Reinheit überprüft.

Waschpuffer:	100,0 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	150,0 mM	NaCl
	5,0 mM	DTT
Elutionspuffer:	100,0 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	150,0 mM	NaCl
	2,5 mM	Desthiobiotin
	5,0 mM	DTT

3.7.3 Regeneration von Strep-Tactin Säulenmaterial

Das Säulenmaterial wurde nach der Proteinreinigung mit 1x Haba Lösung (iba) inkubiert. Die Haba Lösung verdrängt das gebundene d-Desthiobiotin von der Säule. Eine Rotfärbung des Säulenmaterials diente hierbei als Indikator. Die Regeneration der Säule für eine erneute Verwendung erfolgte mit Säulenwaschpuffer I bis das Säulenmaterial wieder die ursprüngliche weiße Färbung aufwies. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 10 SV Säulenwaschpuffer II gewaschen. Die Säule wurde bis zur weiteren Verwendung im Säulenwaschpuffer II gelagert.

Säulenwaschpuffer I:	100 mM	Tris-HCl (pH 10,5)
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
Säulenwaschpuffer II:	100 mM	Tris-HCl (pH 8)
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA

3.7.4 Expressionstest von RirA

Zum Nachweis der Expression des rekombinanten Proteins RirA, sowie zur Ermittlung der optimalen Zeit, Temperatur und IPTG Konzentration für eine möglichst große Menge an löslichem Protein, wurde ein Expressionstest durchgeführt. Hierzu wurden 20 ml LB-Medium, welches mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurde, im Verhältnis 1:100 aus einer Vorkultur beimpft und anschließend bei 37 °C inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,6 erfolgte die Induktion der Expression durch die Zugabe von 100 µM, 200 µM oder 300 µM IPTG. Die anschließende Kultivierung erfolgte bei 17 °C, 25 °C oder 30 °C und 180 rpm. Die Probenentnahme und gleichzeitige Messung der OD₅₇₈ erfolgte nach 0 h (Probe vor Induktion), 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 16 h. Die Proben wurden 20 min bei 11.337 x g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet eingefroren. Um die eingefrorenen Zellsedimente für eine SDS-PAGE aufzubereiten, wurden diese in 40 µl Lysepuffer aufgenommen, resuspendiert und für 30 min bei 25 °C inkubiert. Durch das im Lysepuffer vorhandene Lysozym wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelllysate durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 60 min und bei 4 °C (Biofuge fresco, Heraeus) in lösliche und unlösliche Fraktionen getrennt. Der Überstand wurde in 15 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C zur Denaturierung der Proteine erhitzt. Das Sediment wurde in 40 µl dH₂O und 15 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die unlösliche Fraktion der Zellen wurde für 15 min bei 95 °C zur Denaturierung erhitzt und anschließend bei 10.000 rpm für 20 min bei RT (Biofuge fresco, Heraeus) zentrifugiert. Die Proben wurden im Anschluss auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie Brilliant Blue visualisiert.

Lysepuffer:	0,5 mg/ml	Lysozym in Z Puffer
-------------	-----------	---------------------

Z-Puffer:	60 mM	Na ₂ HPO ₄
	40 mM	NaH ₂ PO ₄
	10 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄

3.7.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sodiumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladungen von Proteinen überdeckt und zusätzlich die vollständige Entfaltung der Peptidkette begünstigt. Durch die Bindung des SDS wird die Oberflächenladung neutralisiert, somit beruht die Auftrennung auf dem molekularen Siebeffekt und findet anhand der molekularen Größe statt. Zusätzlich kommt es durch die Auftrennung bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese zu einem Konzentrierungseffekt, der zu einer höheren Auflösung führt. Für die Elektrophorese wurden 40 µl Proteinlösung mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen wurden durch Zugabe von β-Mercaptoethanol reduziert. Über die Bestimmung der Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Ketten und einen Vergleich mit einem Proteinstandard bekannter Größe, können die Molekulargewichte der Proteine ermittelt werden, da die Proteine ausschließlich nach Größe getrennt werden.

In dieser Arbeit wurden 6 %ige Sammelgele und 15 %ige Trenngele verwendet. Die Gele wurden mit Hilfe des Mini Protean 3 Systems (BioRad, München, Deutschland) gegossen. Anschließend wurden die Proteinlösungen zusammen mit dem Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts) auf das Gel aufgetragen und 30 min bei 45 mA getrennt. Durch eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel zunächst kurz mit der Färbelösung aufgeköcht und anschließend 1 h schüttelnd gefärbt. Danach folgte eine 1-3-stündige Entfärbung der Gele. Anschließend wurden die Gele digitalisiert. Alternativ wurden die Gele mit InstantBlue™ nach Herstellerangaben gefärbt.

Sammelgelpuffer:	0,4 % (w/v)	SDS
	1,5 M	Tris HCl (pH 6,8)

Trenngelpuffer	0,4 % (w/v)	SDS
	1,5 M	Tris HCl (pH 8,8)
Sammelgel	2,0 ml	NF-Acrylamid/Bis (29:1)
(6 %ig, für 4 Gele):	2,5 ml	Sammelgelpuffer
	5,5 ml	dH ₂ O
	10,0 µl	TEMED
	100,0 µl	APS-Lösung (10 %)
Trenngel	10,0 ml	NF-Acrylamid/Bis (29:1)
(15 %ig, für 4 Gele):	5,0 ml	Trenngelpuffer
	5,0 ml	dH ₂ O
	20,0 µl	TEMED
	200,0 µl	APS-Lösung
10x Elektrophoresepuffer:	192 mM	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
	50 mM	Tris/HCl (pH 8,8)
Probenpuffer:	40,0 % (w/v)	Glycerin
	2,0 mM	β-Mercaptoethanol
	110,0 mM	SDS
	3,0 mM	Bromphenolblau
	100,0 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
Färbelösung:	10,0 % (v/v)	Essigsäure
	30,0 % (v/v)	Ethanol
	1,0 g/l	Coomassie Brilliant Blue G-250
Entfärbelösung:	30,0 % (v/v)	Ethanol
	10,0 % (v/v)	Eisessig

3.7.6 Westernblot (Semi Dry-Methode) mittels Strep-Antikörper

Mit Hilfe des Elektroblobs oder Western Blots können SDS-denaturierte Proteine nach der Auftrennung im Gel auf eine Membran (Polyvinylidenfluorid, PVDF) transferiert werden. Die auf die Größe des Gels zurechtgeschnittene PVDF-Membran (Roti-PVDF-Membran, Roth, Karlsruhe) wurde kurz in 100 %igen Methanol äquilibriert und anschließend in 1 x Towbin- Transferpuffer gespült bis sie nicht mehr abperlt. Es wurden ebenso 10 Whatman-Papiere auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und in 1 x Towbin-Transferpuffer benetzt. Um das SDS-Gel für den Proteintransfer vorzubereiten, wurde es für 15 min in 1 x Towbin- Transferpuffer äquilibriert. 5 Whatman-Papiere, die PVDF-Membran, das SDS-Gel und 5 weitere Whatman-Papiere wurden übereinander auf den Elektrobplotter (Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) gelegt und für 30 min bei 10 V geblottet. Das elektrische Feld wurde dabei senkrecht angelegt, sodass die durch das SDS negativ geladenen Proteine auf die Membran transferiert wurden und dort aufgrund hydrophober Wechselwirkungen gebunden bleiben. Nach dem Blot wurde die Membran mit Blocking-Lösung bei RT für 1 h oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach Absättigung der freien Bindestellen wurde dreimal mit 1 x PBS-Tween gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 10 µl Avidin (2 mg/mL) in 10 mL 1 x PBS-Tween für 10 min, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend wurden 2,5 µl Strep-Tactin® Konjugat (IBA, Göttingen, Deutschland) dazugegeben und für 60 min bei RT inkubiert. Das Strep-Tactin® Konjugat bindet hoch spezifisch an den Strep- Tag des Fusionsproteins und ist kovalent an eine alkalische Phosphatase gekoppelt. Es wurde zweimal mit 1 x PBS-Tween und zweimal mit 1 x PBS gewaschen, bevor die Membran für 10 min in alkalischem Phosphatasepuffer äquilibriert wurde. Nach Zugabe der Färbelösung wurden die in der Lösung enthaltenen chromogenen Substrate BCIP und NBT von der alkalischen Phosphatase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Nach erkennbarer Färbung der durch den Antikörper detektierten Proteinbanden wurde die Reaktion mit deionisiertem Wasser abgestoppt. Anschließend wurde die Membran getrocknet und digitalisiert.

Towbinpuffer	25,0 mM	Tris HCl pH 8,5
(Transferpuffer):	150,0 mM	Glycin
	10,0 % (v/v)	Methanol

10 x PBS	1,37 M	NaCl
	27,0 mM	KCl
	100,0 mM	Na ₂ HPO ₄
	20,0 mM	KH ₂ PO ₄
Blocking Lösung:	5,0 % (w/v)	BSA
	0,5 % (v/v)	Tween20
	10,0 %	10 x PBS
Waschlösung:	0,5 % (w/v)	BSA
	0,1 % (v/v)	Tween20
	10,0 %	10 x PBS
PBS Tween:	10,0 % (v/v)	10 x PBS
	0,1 % (v/v)	Tween20
APB (Alkalischer Phosphatase Puffer):	100,0 mM	Tris-HCl pH 9,5
	100,0 mM	NaCl
	5,0 mM	MgCl ₂
Reaktionspuffer:	10,0 ml	APB-Puffer
	33,0 µl	NBT Lösung (50 mg/ml in 70 % DMF)
	66,0 µl	BCIP-Lösung (50 mg/ml in DMF)

3.7.7 Hämin-Färbung (Heme stain)

Der Nachweis der Häminbindung an IscR sollte mit Hilfe der Hämin Färbung getestet werden (modifiziert nach (Molitor *et al.*, 2013). Hämin besitzt eine eigene Peroxidaseak-

tivität und ist in der Lage das im ECL Kit (GE Healthcare) enthaltene Luminol zu oxidieren. Hierdurch entsteht Chemilumineszenz, die detektiert werden kann. Diese Reaktion ist von Vorteil, um die Bindung von Hämin an einem Protein sichtbar zu machen, da das detektierte Produkt den Bereich anzeigt, in dem das Hämin vorliegt.

Anaerob gereinigtes IscR Protein wurde mit einer Konzentration von 40 μM mit äquimolaren Mengen Hämin für 5 min anaerob inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz über eine Gelfiltrationssäule gegeben, um ungebundenes Hämin abzulösen. Als Kontrollen wurden eine IscR Proteinlösung ohne Hämin, eine Lysozymlösung mit Hämin, eine Lysozymlösung ohne Hämin sowie eine Häminlösung ohne Protein eingesetzt. Diese wurden analog zu der IscR Probe hergestellt. In jedem Schritt wurden 40 μl von den Ansätzen für eine SDS-PAGE entnommen. Zu den SDS-Proben wurden 15 μl 4 x SDS-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol hinzugegeben, damit eine Dissoziation des Hämins vom Protein verhindert wird. Im Gegensatz zu einer herkömmlichen SDS PAGE wurden die Proben nicht für 5 min bei 95 °C erhitzt, da ein Denaturieren des Proteins und damit einhergehender Verlust des Hämins vermieden werden sollte. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 11.337 x g zentrifugiert und in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Das Auftragsschema der Proben erfolgte im Doppelansatz, sodass ein Gel zweimal die identisch aufgetragenen Proben in gleicher Reihenfolge enthielt. Hämin wandert im SDS Gel auf Höhe der Lauffront und kann nicht angefärbt werden. Nach dem Lauf der SDS-PAGE wurde das Gel geteilt. Die eine Gelhälfte wurde für die Hämin Färbung eingesetzt und die identisch andere Gelhälfte wurde mit InstantBlueTM gefärbt, um die Proteinbanden zu visualisieren. Für die Häminfärbung wurden die Proteine mit gebundenem und freiem Hämin auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare) mit dem Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfercell (Bio-Rad) transferiert. Die Aktivierung der Membran erfolgte in deionisiertem H₂O und Lagerung für 10 min in Transferpuffer. Das SDS Gel wurde ebenfalls für 10 min in Transferpuffer gelagert und die Whatman-Papiere für ca. 1 min. Für den Blot wurden 5 Whatman-Papiere auf die Anodenplatte gelegt, gefolgt von der Membran, dem SDS Gel und abschließend erneut 5 Whatman-Papieren. Der Transfer des SDS-Gels auf die Trägermembran erfolgte bei konstanten 10 V und 30 min. Nach dem Blot wurden die Banden des Referenzmarkers sowie die SDS-Geltaschen auf der Membran markiert und diese 2 x für 5 min in PBS Puffer gewaschen. Die Trägermembran wurde mit dem ECLTM Prime Western Blotting (GE Healthcare) Kit behan-

delt. Da die Lösungen sowie die Reaktion lichtempfindlich sind, wurden die nachfolgenden Schritte unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Lösungen aus dem Kit wurden auf Raumtemperatur erwärmt und in einem Verhältnis von 1:1 in einem Volumen von 800 µl gemischt und auf die Membran aufgetragen. Die Detektion der Chemilumineszenz des oxidierten Luminols durch die Peroxidase Aktivität des Hämins erfolgte mit der CCD Kamera (Cool-Snap™ HQ2 Photometrics) in der Chemilumineszenz Dokumentationsanlage (Decon DC SCIENCE TFC).

4 x SDS Probenpuffer ohne	100,0 mM	Tris HCl pH 6,8
β-Mercaptoethanol:	110,0 mM	SDS
	40,0 % (v/v)	Glycerin
	3,0 mM	Bromphenolblau
10 x PBS	1,37 M	NaCl
	27,0 mM	KCl
	100,0 mM	Na ₂ HPO ₄
	20,0 mM	KH ₂ PO ₄
Transferpuffer:	21,3 mM	Tris HCl pH 8,5
	192,0 mM	Glycin
	10,0 % (v/v)	Methanol

3.7.8 Butanon Extraktion

Für die Untersuchung der Bindungsart von Hämin an IscR wurde eine Butanon Extraktion nach (Molitor *et al.*, 2013) durchgeführt. Kofaktoren können auf unterschiedliche Arten an Proteine gebunden sein. Für Häm hängt die Art der Bindung stark von der Funktion ab. So ist das Häm im Cytochrom c kovalent gebunden im Gegensatz zum nicht kovalent gebundenem Häm in Hämoglobin (Deckwer *et al.*, 1999). Für die Untersuchung der Bindungsart können Lösungsmittel wie Butanon genutzt werden. Durch Ansäuern der Proteinlösung denaturiert das Protein und nicht kovalent gebundenes Häm kann durch die Zugabe des Lösungsmittels aus dem Protein gelöst werden (TEALE, 1959). Bei der Einstellung der Phasentrennung ist nicht-kovalent gebundenes Häm in der organischen Phase zu beobachten und kovalent gebundenes Häm verbleibt am Protein in der wässrigen Phase.

Für die Butanon Extraktion wurden 30 μM anaerobes IscR mit 60 μM Hämin versetzt und für 5 min inkubiert. Das überschüssige, nicht gebundene Hämin wurde durch eine Gelfiltrationssäule entfernt. Die Protein-Hämin Lösung wurde durch die Zugabe von 1 M HCl Lösung bis zu einem pH-Wert von 1,5 bis 2 angesäuert, um das IscR Protein zu denaturieren. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 μl vorgekühlter 2-Butanonlösung. Der Ansatz wurde bis zur Phasentrennung auf Eis inkubiert. Als Kontrollen wurden zum einen 60 μM Hämoglobin und zum anderen 60 μM Cytochrom c verwendet. Diese wurden ebenfalls durch Zugabe von HCl denaturiert und die Hämbindung durch die Zugabe von Butanon untersucht.

3.7.9 Umpuffern des Proteins über eine NAP-Säule

Für einige Versuche war es nötig die Proteine einem Pufferwechsel zu unterziehen. Hierfür wurden die Proteine über eine NAP-Säule (GE Healthcare) entsalzt und parallel umpuffert. Das Protein wandert in das Säulenmaterial und kann anschließend durch die Zugabe des gewünschten Puffers in diesem eluiert werden. Das Abtrennen von ungebundenem Hämin erfolgte ebenfalls unter Verwendung einer NAP-Säule. Das Umpuffern von Proteinen, sowie das Abtrennen von ungebundenem Hämin erfolgte wie nach Herstellerangaben vorgegeben.

3.7.10 Konzentrierung der Proteinlösung

Um einer Erhöhung der Proteinkonzentration zu erzielen, wurde eine Konzentrierungssäule mit einem Fassungsvermögen von 500 μl und einem Ausschlussvolumen von 10 kDa verwendet (Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane). Die Konzentrierung der Proteinlösungen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.7.11 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mithilfe des 2D-Quant Kits (GE Healthcare), nach Herstellerangaben, durchgeführt. Als Standard wurde BSA verwendet. Jede Proteinkonzentrationsbestimmung wurde im Doppelansatz durchgeführt.

3.7.12 Eisenbestimmung nach Loevenberg

Die Eisenbestimmung wurde jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Standard wurde eine 500 μM Fe(II)-Lösung verwendet, welche aus einer Standardlösung für die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) Bestimmungen (Fluka) 1:36 verdünnt hergestellt wurde. Für die Standardkurve wurden 0, 0,5, 1, 2, 4 und 8 nmol Fe in 65 μl eingesetzt.

Die Proben wurden in einem Volumen von 15 µl und 30 µl eingesetzt und jeweils mit H₂O auf 65 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach der Zugabe von 45 µl 1 M PCA wurden die Proben gevortext und für 15 min bei RT inkubiert. Um Zellfragmente zu entfernen, wurden die Proben bei 10.000 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend 90 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 72 µl Bathophenanthrolin-Disulfat-Lösung (1,7 mg/ml), 36 µl Natriumascorbat (38 mg/ml) und 27 µl 1:3 verdünnte, gesättigte Ammoniumacetat-Lösung hinzugegeben. Das Gemisch wurde gevortext und für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Zur Bestimmung des Eisengehalts wurde die optische Dichte bei 535 nm und 680 nm in einer Quarzküvette gemessen. Um aus der Standardkurve den Eisengehalt in der eingesetzten Proteinmenge zu ermitteln, wurde die Differenz aus OD₅₃₅-OD₆₈₀ bestimmt.

3.7.13 Eisenbestimmung mittels der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Für die AAS wurden 50 µM Proteinlösungen 100-fach mit hoch reinem Wasser (Sartorius arium pro VF (Leitfähigkeit 0,005 µS/cm)) verdünnt. Für die Eisenbestimmung wurde ein contrAA 700 hoch auflösendes Atomabsorptionsspektrometer mit kontinuierlicher Quelle (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) verwendet. Für die Eisenkalibrierung wurde ein Eisenstandard speziell für AAS Messungen (Sigma Aldrich, München, Deutschland) verwendet, welcher mit hoch reinem Wasser auf Mengen zwischen 0 und 200 µg/l verdünnt wurde. Die Proben sowie die Kalibrier Standards wurden in einem Volumen von 20 µl in ein Graphit Röhrchen injiziert. Dies beinhaltete 20 µl HNO₃ (13 %) als Modifikator. Eisen wurde bei einer Wellenlänge von 248,3270 nm gemessen und für die Auswertung wurde der Median von jeweils drei Messungen verwendet. Das verwendete Temperaturprogramm kann der Tabelle 12 entnommen werden. Die AAS Messung wurde in Kooperation mit der AG Ott aus der Abteilung Medizinische und Pharmazeutischen Chemie der TU Braunschweig durchgeführt.

Tabelle 12: HR-CS AAS Temperatur Programm für Eisen Messungen

Schritt	Temp. [°C]	Ramp [°C/s]	Hold [s]	Argon purge
Trocknung	80	6	15	max
Trocknung	90	10	45	max
Trocknung	105	7	60	max
Trocknung	500	50	30	max
Pyrolyse	1100	200	20	max
Gas Adapta- tion	1100	0	5	stop
Atomisierung	2250	1500	4	stop
Waschen	2500	500	5	max
Kühlen	1500	NP ¹	5	max
Waschen	2450	500	5	max

¹NP = no power

3.7.14 Schwefelbestimmung

Die Schwefelbestimmung wurde jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Standardkurvenbestimmung wurde eine 20 mM Li₂S Lösung in 0,03 M NaOH hergestellt und auf 200 µM verdünnt. Für die Standardkurve wurden 0, 1, 5, 10, 15 und 20 nmol S²⁻ in 100 µl eingesetzt. Die Proteinproben wurden jeweils in 30 µl und 60 µl eingesetzt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Zu den Proben wurde in sehr kurzem Abstand 300 µl 1 %iges Zn(OAc)₂·2 H₂O und 15 µl 3 M NaOH hinzugegeben. Bei längerem Warten würde nach Zugabe des Zinkacetats Schwefelwasserstoff entweichen. Das Gemisch wurde gevortext und für 5-10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 75 µl 0,1 %iges DMPD und 16 µl 23 mM FeCl₃. Die Proben wurden gevortext und die Proben der Standardbestimmung für mindestens 30 min und die Proteinproben für 3 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und die optische Dichte bei 670 nm in einer Quarzküvette gemessen. Aus der Standardkurve wurde der Schwefelgehalt in der eingesetzten Proteinmenge bestimmt (Beinert *et al.*, 1997).

3.7.15 Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Clustern

Für eine erfolgreiche Rekonstitution wurde das gereinigte Protein über eine NAP Säule entsalzt und der Proteingehalt bestimmt. Zu der Proteinlösung wurden 10 mM DTT hinzugegeben und für 1 h inkubiert. Das DTT reduziert Cysteine und verhindert so die Bildung eventueller Disulfidbrückenbindungen. Das Fe-Ammoniumcitrat wurde in leichtem Überschuss dazugegeben. Bei einer 100 μM Proteinlösung und zwei möglichen $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ Clustern würde das einer Konzentration von 900 μM entsprechen. Für die RirA und IscR Proteinlösungen wurden 10 mM Fe-Ammoniumcitrat eingesetzt. Das Gemisch wurde für 5 min inkubiert bis eine leicht rötliche Färbung zu erkennen war. Anschließend wurde das Lithiumsulfid im gleichen Verhältnis wie das Fe-Ammoniumcitrat tropfenweise hinzugegeben. Bei zu schneller Zugabe des Lithiumsulfids kann Eisensulfid entstehen, welches irreversibel an das Protein bindet. Die Inkubation erfolgte bei 20 °C für 15 min bis zu 3 h, bis eine rötlichbraune bis dunkelbraune Färbung zu erkennen war. Bei einer grauschwarzen Färbung wurde Eisensulfid gebildet. Anschließend wurde die Lösung für 5 min bei 11.337 x g abzentrifugiert. Hierbei bildete sich eventuell ein schwarzes Eisensulfid Pellet. Der Überstand wurde abgenommen und erneut über eine NAP-Säule entsalzt. Die Eisenbestimmung sowie die Schwefelbestimmung wurden wiederholt (Kühner *et al.*, 2014).

3.7.16 UV/Vis Spektroskopie

In der UV/Vis Spektroskopie ist es möglich absorbierende Bereiche eines Proteins im ultravioletten Licht (UV) und im sichtbaren Bereich (Vis) zu detektieren. Während der Absorption von Licht einer geeigneten Frequenz kommt es zur Energieanregung von Molekülen, die abhängig von ihrem Extinktionskoeffizienten, der Konzentration der Lösung und der Schichtdicke der Küvetten ein spezifisches UV/Vis Spektrum zeigen (Bienz *et al.*, 2016). Proteine die Kofaktoren gebunden haben absorbieren im sichtbaren Bereich und zeigen charakteristische Absorptionen bzw. Spektren im UV/Vis (Holtzhauer, 1996).

Für die UV/Vis Messung anaerob gereinigter Proteine, wurden die Proteine mit einer Konzentration zwischen 0,1 mg/ml und 1 mg/ml in einem Volumen von 500 μl in eine Quarzküvette (Präzisionsküvette aus Quarzglas SUPRASIL®) mit einer Schichtdicke von 10 mm überführt und luftdicht verschlossen. Die Proteinlösungen wurden im UV/Vis Spektrometer (V-650 Spektrometer, JASCO) in einem Wellenlängenbereich von 200 nm bis 800 nm vermessen und mit Hilfe des Programms Spectra Manager (JASCO) ausgewertet. Eine Reduktion der Proben erfolgte durch Zugabe von 12 mM Natriumdithionit

oder durch die Zugabe von 50 μM Deazaflavin und der Bestrahlung von Licht für 5 Minuten.

3.7.17 ESR Messungen

Die Elektronenspinresonanz Spektroskopie (ESR) ist eine spektroskopische Analyse zur Untersuchung von Molekülen mit ungepaarten Elektronen, wie sie in Radikalen oder Metallkomplexen zu finden sind (Skrabal, 2009). Bei der ESR Spektroskopie wird die sogenannte Resonanzenergie erfasst, die durch das konstante Einstrahlen einer spezifischen Wellenlänge, Einfluss auf das externe Magnetfeld nimmt. Dies kann gemessen werden und dadurch entsteht im ESR Spektrum ein Peak, der Hinweise auf ein paramagnetisches Molekül gibt. Der Paramagnetismus entsteht durch gepaarte Elektronen die in höheren Orbitalen vorliegen und keinen gegenläufigen Spin besitzen, wodurch der magnetische Effekt zunimmt (Drescher *et al.*, 2012). Die Lage des gemessenen Spektrums wird durch den g-Wert angegeben und gibt näheren Aufschluss über die Art des Signals. Die g-Werte sind je nach Art der gemessenen Probe charakteristisch.

Die Probenvorbereitung für die ESR Messungen erfolgte in einem Anaerobenzelt unter Sauerstoffausschluss (Coy Laboratories, Grass Lake, USA). Die Vermessung von anaeroben Proteinlösungen erfolgte in Konzentrationen von 20 μM bis 400 μM in Pufferlösungen ohne DTT in Wilmad Quarz (CFQ) ESR Röhrchen (Wilmad 707-SQ-250M, Sigma-Aldrich®). Diese wurden luftdicht verschlossen und bis zur Vermessung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die ESR Messungen wurde an einem EMX X-Band-Spektrometer (ca. 9,4 GHz) der Firma Bruker durchgeführt. Die Tieftemperaturmessung erfolgte in einem ESR 900 Cryostat (Oxford Instruments) unter stetiger Zufuhr von flüssigem Helium zur Kühlung. Die ESR Spektren wurden bei Temperaturen zwischen 4 K und 100 K aufgenommen und mit dem Programm EasySpin 5.2.11 ausgewertet. Die Integralintensitäten wurden mit Origin 8.6 (Origin Lab, North Hampton, USA) bestimmt, durch die Verwendung einer Korrektur für Hintergrundsignale. Als Referenz für die Spin Quantifizierung wurde 1 mg Cu(II) EDTA in dem jeweiligen Proteinpuffer gelöst und bei 4,60 K unter nicht gesättigten Bedingungen gemessen. Alle Messungen wurden in Kooperation mit der AG Bröring aus dem Institut für Allgemeine und Angewandte Chemie der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt.

3.7.18 Zugabe zweiwertiger Ionen

Um potentiell freie Positionen in einem Fe-S Kubus zu besetzen wurden der Protein Lösung zweiwertige Ionen hinzugegeben. Hierzu wurden Ni(II)-Chlorid, Cd(II)-Chlorid und Fe(II)-Chlorid in einem 1,5 fachen Überschuss zu einer 100 μ M Proteinlösung hinzugegeben und für 5 min unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben in ESR Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben konnten anschließend im ESR vermessen werden.

3.7.19 Zyklische Voltammetrie

Die zyklische Voltammetrie dient der Messung von Redoxpotentialen durch elektrochemische Reduktion. Die Fe-S Cluster in Proteinen sind häufig am Elektronentransport beteiligt und weisen deshalb ein Redoxpotential auf. Die Proteinproben wurden anaerob aufgereinigt und 100 μ l einer 120 μ M Lösung in HPLC Probenfläschchen überführt. Unter konstanter Zufuhr eines Stickstoffstroms wurde die Proteinlösung sauerstofffrei in eine anaerobe Messapparatur überführt und in einer Stickstoff Atmosphäre vermessen. Als Referenzelektrode diente eine Silber-Silberchlorid Elektrode (3 mol/L KCl). Als Gegenelektrode wurde ein Platin Draht verwendet und eine Glaskohlenstoffelektrode diente als Arbeitselektrode. Die Arbeitselektrode wurde vor jeder Messung präpariert (Aliverti *et al.*, 1995).

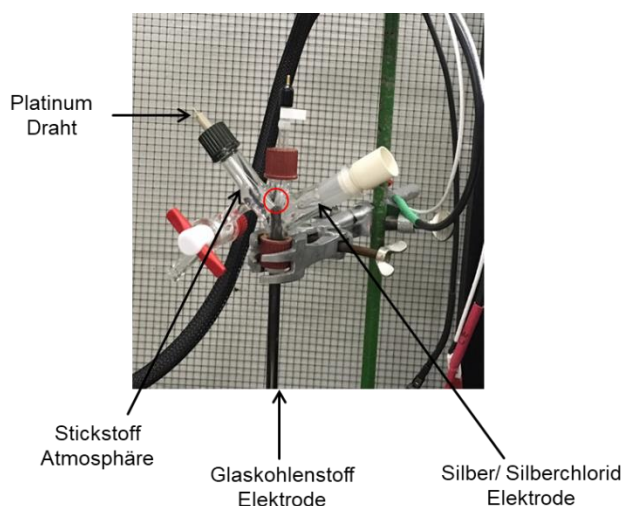


Abb. 13: Aufbau der Messungen von Redoxpotentialen mittels Zyklischer Voltammetrie. Der Platindraht als Gegenelektrode, sowie die Glaskohlenstoffelektrode als Arbeitselektrode und die Silber/Silberchloridelektrode als Referenzelektrode sind durch Pfeile markiert. Die Messung wurde unter einer Stickstoffatmosphäre, die in der gesamten Apparatur herrschte vorgenommen und die Platzierung der Probe ist durch einen roten Kreis gekennzeichnet.

3.7.20 Mössbauer Analyse von Proteinen aus einem *E. coli* Gesamtzellextrakt

Für die Mössbauer Analyse von RirA aus *D. shibae* wurde der Gesamtzellextrakt der überproduzierenden *E. coli* Zellen vermessen. Hierzu wurde als Referenz der Stamm BL21CD+(DE3)-RIL pET52b(+) pRKSUF017 verwendet, der den Hintergrund an freiem Eisen und an Protein gebundenem Eisen darstellt. Für die Messung von rekombinanten RirA wurde der Stamm BL21CD+(DE3)-RIL pET52b(+) *rirA* pRKSUF017 verwendet, der in der Lage ist das rekombinante RirA Protein nach der Induktion mit IPTG über zu produzieren. Die Zellen werden aus einer Übernachtskultur in LB Medium mit entsprechenden Antibiotika und einer OD₅₇₈ von 0,05 angeimpft, bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6 kultiviert und anschließend mit 100 µM IPTG induziert. Parallel zur Induktion wurde das Medium mit ⁵⁷Fe-Citrat (34 µM) versetzt. Die weitere Kultivierung erfolgte bei 25 °C und 180 rpm. Nach der Inkubation über Nacht hatten die Zellen eine OD₅₇₈ von ca.4. Die Zellen wurden in Erntebecher überführt und für 2 h im Anaerobenzelt anaerobisiert. Nach der Erntezentrifugation bei 3.000 rpm und 4 °C für 20 Minuten wurde das Zellpellet 3x mit Mössbauer-Puffer gewaschen. Mit einem Spatel wurde die Zellmasse in ein Mössbauer Töpfchen überführt. Um die Dichtigkeit des Töpfchens zu erhöhen, wurde der Schraubverschluss mit Teflon Band umwickelt. Die Mössbauer Töpfchen wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Messung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Mössbauer-Puffer:	100 mM	Tris HCl pH 7,5
	150 mM	NaCl
	5 % (v/v)	Glycerin

3.7.21 Herstellung einer ⁵⁷Eisen-Citrat Lösung

⁵⁷Eisen hat ein Molekulargewicht von 56,94 g/mol/l, wobei 1 M = 1.000.000 µM entsprechen. Für die Mössbauer Messung wurde eine Endkonzentration von 34 µM/l ⁵⁷Fe benötigt. Diese 34 µM entsprechen 0,001935 g des ⁵⁷Fe. Da das ⁵⁷Fe in ungelöster Form als Feststoff vorliegt, wurde dieses in Zitronensäure gelöst. Zitronensäure ist ebenfalls ein Feststoff mit einem Molekulargewicht von 214,14 g/mol als Monohydrat. Daher wurden zuerst 19,61 mg Zitronensäure in 1 ml H₂O gelöst. Bei einer Eisencitratlösung liegen die Äquivalente bei 1:1, für die Herstellung von ⁵⁷Eisencitrat wurde die Zitronensäure jedoch in einem dreifachen Überschuss eingesetzt. Zum Lösen des ⁵⁷Fe wurden 1,94 mg in 1 ml gelöster Zitronensäure in einem 2 ml Reaktionsgefäß gelöst. Die Lösung wurde für 20 h

bei 60 °C im Thermoblock unter dem Abzug bis zur vollständigen Auflösung des ^{57}Fe inkubiert. Um Gasbildung und Druck im Reaktionsgefäß zu verhindern, wurden mit einer kleinen Nadel Löcher in den Deckel des Reaktionsgefäßes gestochen und diese mit Parafilm verschlossen, um ein Verdampfen der Lösung zu verhindern. Nachdem das ^{57}Fe gelöst war, wurde es mit einem kleinen Filter (PVDF Membran, 0.45µm) filtriert, um die Überreste des ungelösten Eisens zu entfernen, da diese später im Pellet bei der Mössbauer-Messung stören. Das gelöste ^{57}Fe wurde mit 3 M NaOH vorsichtig auf einen pH Wert von ca. 5 bis 5,5 eingestellt. 500 µl dieser Lösung wurden im Anschluss zu 500 ml der Zellen gegeben.

3.7.22 Analytische Gelpermeationschromatographie (GPC)

Mittels Gelpermeationschromatographie können Moleküle nach ihrer nativen, molekularen Masse und Form getrennt werden. Das Säulenmaterial besteht aus porösen Kügelchen aus hochvernetztem Agarosegel mit kovalent gebundenem Dextran. Für die in dieser Arbeit durchgeführte analytische GPC zur Bestimmung der nativen Molekularmasse eines Proteins, wurde eine Superdex 75 HR 10/30-Säule von Amersham Biosciences (Picataway, USA, $V_t = 24$ ml, Trennleistung: 3.000 – 70.0000 M_r) verwendet. Kleine Moleküle können in die Säulenmatrix diffundieren und haben dadurch eine größere Verweildauer auf der Säule als große Moleküle, die mit dem Laufpuffer schnell von der Säule eluieren. Die Trennung erfolgte anaerob bei 17 °C mit GPC-Puffer. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Es wurden 200 µl einer der Protein-Lösung mit einer Konzentration von 200 µM auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Durch separate Eichläufe mit Eichproteinen bekannter nativer, molekularer Masse konnte die relative molekulare Masse des zu untersuchenden Proteins bestimmt werden. Als Eichproteine (Gel Filtration Molecular Weight Markers, Sigma) wurden Cytochrom C mit einem Molekulargewicht von 12,4 kDa, Carboanhydrase mit einem Molekulargewicht von 29 kDa, und Albumin mit 66 kDa verwendet.

GPC Puffer:	100 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	150 mM	NaCl

3.7.23 Gelretardationsanalyse (EMSA, „Electrophoretic Mobility Shift Assay“) mit gereinigtem RirA und IscR aus *D. shibae*

Die Gelretardationsanalyse ist eine Standard *in vivo* Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Protein-DNA-Komplexen. Hierbei wird ein markiertes DNA-Fragment mit gereinigtem Protein inkubiert. Die markierte DNA kann sowohl ungebunden als auch gebunden in einem Protein-DNA-Komplex nachgewiesen werden. Anhand des Laufverhaltens der markierten DNA können Komplexe detektiert werden. Bei der Komplexbildung kommt es neben der Bande der ungebundenen DNA, auch zu einer höher laufende Bande („Band-Shift“), welche auf die Komplexbildung hindeutet.

DIG-labeling der Oligonukleotide

Die einzelsträngigen Primer wurden für 5 min bei 95 °C erhitzt und langsam über einen Zeitraum von 3 h abgekühlt, damit es zur Ausbildung von doppelsträngigen DNA Fragmenten kommt. Anschließend erfolgte die Markierung der DNA für 15 min bei 37 °C. Für das DIG-labelling wurde das DIG Oligonukleotid 3'-End Labeling Kit, 2 Generation (Roche) verwendet. Durch die Zugabe von 2 µl einer 2 mM EDTA Lösung pH 8 und 3 µl H₂O wurde die Reaktion abgestoppt. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl wurde abschließend mit dem PCR Purification Kit (Quiagen, Deutschland) aufgereinigt und in 100 µl 2 mM Tris-HCL pH 8,2 Lösung eluiert.

Dot Blot

Um die Effizienz der Markierung zu kontrollieren, wurde ein Dot Blot durchgeführt. Hierzu wurde eine Kontroll-DNA vom Hersteller verwendet. Durch den Intensitätsvergleich der markierten DNA und der Kontroll-DNA konnte eine Aussage über die Konzentration gemacht werden. Die markierten Fragmente sowie die markierte Kontroll-DNA aus dem DIG-Markierungs-Kit wurden 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 2 µl auf eine Nylonmembran getropft. Nach dem Autocrosslinken im UV-Crosslinker wurde die Membran in 10 ml 1 x Blockinglösung für 40 min inkubiert. Danach folgte die 30-minütige Inkubation mit einer Lösung aus 0,5 µl DIG-Antikörper in 10 ml Blockinglösung. Nach der Inkubation wurde die Membran 4 x mit Waschpuffer für 10 min gewaschen. Im Anschluss folgte eine Inkubation für 5 min mit Detektionspuffer. In dieser Zeit wurde die CDP-Star-Lösung vorbereitet, indem zu 1 ml Detektionspuffer 10 µl CDP-Star gegeben wurde. Da das Reagenz lichtempfindlich ist, wurde das Eppendorfgefäß in Alufolie eingepackt. Anschließend wurde die

Membran mit der Detektionslösung beträufelt und in Folie eingeschweißt. Die Membran wurde so für 1 h im Dunkeln gelagert und konnte anschließend mit der Chemilumineszenz-Anlage detektiert werden.

Bindereaktion

Für die Bandshifts wurden die Proteine aus *D. shibae* anaerob gereinigt. Aufgrund der Sauerstoffempfindlichkeit wurden alle folgenden Schritte im Anaerobenzelt mit anaerobisierten Lösungen durchgeführt. Als markierte DNA Fragmente wurden zum einen 155 bp lange DNA Fragmente des *hemB2* Promoters und verkürzte 41 bp Fragmente mit eingeführten Mutation des *hemB2* Promoters sowie 195 bp lange *iscR* Promotor Fragmente verwendet. Das Gesamtvolumen der Bindereaktion betrug 10 µl. Entsprechend der Ansätze wurden optimierter Elli-Puffer und H₂O vorgelegt und DNA in der gewünschten Konzentration hinzugegeben. Anschließend wurde das gereinigte Protein in verschiedenen Konzentrationen dazugegeben. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei 17 °C.

Elli-Puffer opt:	25 mM	Tris-HCl pH 7,5
	100 mM	KCl
	5 mM	MgCl ₂
	50 µg/ml	BSA
	5 %	Glycerin
	1 mM	DTT

Native Polyacrylamid Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proben wurde ein 6 %iges Polyacrylamidgel verwendet. Um die Auspolymerisierung des Gels zu beschleunigen, wurde das Gemisch aus Wasser-, TBE- und Polyacrylamid in einem Wasserbad für 10 min erhitzt. Nach der Zugabe von APS und TEMED wurde die Lösung sofort zwischen zwei fettfreie Glasplatten pipettiert. Anschließend wurden die Gele in die Gel-Elektrophoreseapparatur eingespannt, ins Anaerobenzelt eingeschleust, mit anaerobisierten 0,5 %igen TBE-Puffer bedeckt und über Nacht im Anaerobenzelt gelagert. Vor der Benutzung lief das Gel für 1 h bei 100 V (Biometra, Standard Power Pack P25). Als Längenmarker wurden 4 µl eines 10 x Probenpuffers verwendet, welcher den Farbstoff Xylene Cyanol FF^b enthielt. Das Wanderungsverhalten entsprach dem eines 260 bp Fragments. Für 1 Gel wurde eine Spannung von 100 V und 3-4 mA angelegt. Die Laufdauer betrug je nach Größe des DNA Fragments 60-90 min.

Polyacrylamidgel	2,0	ml	30 %ige Acrylamidlösung
	0,5	ml	10 x TBE-Puffer
	7,5	ml	dH ₂ O
	60,0	µl	APS
	3,0	µl	TEMED
10 x TBE-Puffer	890,0	mM	Tris
	20,0	mM	EDTA
	890,0	mM	Borsäure

Kontaktblot

Die im Polyacrylamid aufgetrennte DNA wurde auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roth, Karlsruhe, Deutschland) transferiert. Hierzu wurde eine passend zugeschnittene Nylonmembran auf das Gel gelegt und glatt gestrichen um Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurden drei Lagen 3 mm Whatman Filterpapier darauf gelegt und durch eine Glasflasche beschwert. Es wurde für 1,5 h geblottet. Nach dem Blotten wurde die Membran auf trockenes Filterpapier gelegt, die Taschen mit einem Bleistift markiert, überschüssige Gelreste entfernt und die DNA auf der Membran im UV-Crosslinker (Stratagene, UV Stratalinker 2400) mit dem Programm Autocrosslink fixiert. Die Membran konnte bis zur Detektion bei 4 °C gelagert werden oder direkt detektiert werden.

Immundetektion mit CDP-Star

Die Nylonmembran wurde in einem Falcon eingerollt und für 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte das Blocking für 40 min in 10 ml 1 x Blockinglösung, in Maleinsäurepuffer verdünnt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 10 ml DIG-Antikörperlösung für 30 min. Die Membran wurde dann 4 x mit 10 ml Waschpuffer für jeweils 10 min gewaschen und abschließend für 5 min in Detektionspuffer geschwenkt. In dieser Zeit wurde die Detektionslösung vorbereitet. Hierzu wurde 1 ml Detektionslösung mit 10 µl CDP-Star versetzt und in Alufolie verpackt. Die Membran wurde mit der CDP-Star Lösung beträufelt, luftblasenfrei eingeschweißt und für 1 h im Dunkeln gelagert. Das Substrat CDP-Star wurde durch die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase umgesetzt und es kam zu einer Lichtreaktion, die nach der Inkubation in der Chemilumineszenz-Anlage detektiert werden konnte.

Maleinsäurepuffer	100,0 mM	Maleinsäure
	150,0 mM	NaCl
	mit NaOH auf pH 7,5 einstellen	
Waschpuffer	3,0 ml	Tween 20
	1,0 l	Maleinsäurepuffer pH 7,5
Detektionspuffer	100,0 mM	Tris-HCl pH 9,5
	100,0 mM	NaCl
10 x Blockierungslösung	5,0 g	Blocking-Reagenz
	50,0 ml	Maleinsäurepuffer pH 7,5
DIG-Antikörperlösung	10,0 ml	1 x Blockinglösung
	0,5 µl	Anti-DIG
CDP-Star Lösung	1,0 ml	Detektionspuffer
	10,0 µl	CDP-Star

Tabelle 13: Verwendete Primer für EMSA Experimente

DNA / Promotorfragment	Größe	Primer 1	Primer 2
<i>hemB2</i>	155 bp	EH603DIG	EH604DIG
<i>hemB2</i>	41 bp	MB19	MB21
<i>hemB2_mut1</i>	41 bp	MB20	MB22
<i>hemB2_mut2</i>	41 bp	MB29	MB30
<i>hemB2_mut3</i>	41 bp	MB31	MB32
<i>hemB2_mut4</i>	41 bp	MB33	MB34
<i>hemB2_mut5</i>	41 bp	MB35	MB36
<i>hemB2_mut6</i>	41 bp	MB37	MB38
<i>hemB2_mut7</i>	41 bp	MB39	MB40
<i>iscR</i>	195 bp	EH683DIG	EH684DIG
<i>napF</i>	176 bp	EH647	EH648

3.7.24 DNaseI-Footprint mit gereinigtem RirA aus *D. shibae*

Transkriptionsfaktoren können an spezifische Bereiche der DNA binden und mittels Footprint Analysen können diese Bereiche identifiziert werden. Um die Bindestelle von RirA an den *hemB2* Promotorbereich näher zu untersuchen, wurden DNaseI Footprint Analysen durchgeführt. Das Enzym DNaseI ist in der Lage zufällig sowohl ssDNA als auch dsDNA in Mononukleotide und Oligonukleotide zu fragmentieren. Durch die Markierung mit Digoxigenin (DIG) entsteht ein spezifisches, nachweisbares Bandenmuster. Kommt es allerdings zur Bindung des Regulators an Bereiche der DNA werden diese durch das Protein geschützt. Diese DNA Bereiche können nicht fragmentiert werden und weisen somit kein Bandenmuster auf. Dieser geschützte Bereich wird als „Footprint“ bezeichnet. Für den DNaseI Footprint wurde ein 155 bp langes Fragment des *hemB2* Promoters, welches den Bereich von -99 bis +56 vom potentiellen Transkriptionsstart ausgehend abdeckt, mit einer PCR unter Verwendung eines unmarkierten und eines DIG-markierten Primers amplifiziert. Hierfür wurden die Primerpaare DIG-EH691/ EH696 und EH695/ DIG-EH692 verwendet und genomische DNA als Matrize verwendet. Ca. 50 ng des DIG-markierten PCR Produkts wurden ohne und mit Zugabe von steigenden Mengen anaerob gereinigtem RirA Protein in 20 µl DNA-Bindepuffer für 40 min bei Raumtemperatur unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Die RirA Mengen lagen bei 82 µM, 136 µM, 273 µM und 546 µM. Im Anschluss wurde der DNaseI Verdau für 20 sec durchgeführt. Hierfür wurde die DNaseI entsprechend der Herstellerangaben verdünnt (Merck, Darmstadt, Germany). Ein Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung.

DNA-Bindepuffer:	25	mM	Tris-HCl pH 7,5
	100	mM	KCl
	5	mM	MgCl ₂
	5	%	Glycerin
	1	mM	DTT
DNase-Stopp-Lösung:	15	µM	EDTA
	10	µg/ml	Hefe Carrier tRNA (Invitrogen, USA)

Labeled Primer Cycle Sequencing

Für die Sequenzier-Reaktion der DNA wurde das Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB Corporation, Ohio, USA) verwendet und 100 ng des PCR Produkts, das durch die Primerpaare EH695/ EH696 aus genomischer DNA amplifiziert wurde. Für die Sequenzierreaktion wurden 0,2 ml Reaktionsgefäße verwendet. 100 ng des PCR Fragments wurden mit 4 µl eines Terminationsmixes und 4 µl eines Mastermixes zusammen pipetiert und eine PCR durchgeführt.

Mastermix:	2,0 µl	Thermo Seq Reaktionspuffer
(für Sequenzier-Reaktion)	1,0 µl	DIG markierter Primer (DIG-EH691 oder DIG-EH692, [10 pmol/µl])
	10,2 µl	steriles, dH ₂ O
	1,0 µl	Thermo Sequenase DNA Polymerase (4U/µl)

Reaktionsbedingungen der PCR

Denaturierung der DNA	96 °C	30 sec	} 30 Zyklen
Annealing des Primers	60 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	60 sec	
Pause	10 °C	∞	

Zum Abstoppen der Sequenzierreaktion wurden 4 µl Stopp-Lösung zum Ansatz pipetiert, gut gemischt und die Reaktionsgefäße bei -20 °C gelagert.

Gellauf und Kapillarblot

Die DNA Fragmente nach dem DNaseI Verdau sowie die DNA Sequenzier-Reaktionen wurden in einem 7 M Harnstoffgel mit 6 % Polyacrylamid aufgetrennt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für 3 min bei 85 °C erhitzt und das Gel für 1 h in einem Vorlauf erwärmt. Es wurden jeweils 1,5 µl der Proben auf das Gel aufgetragen und bei 21 mA und 250 V für ca. 75 min aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte ein Blot der DNA Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran. Diese wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und Luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Darüber wurden vier Lagen 3 MM

Whatmanpapier (GE-Healthcare, München, Deutschland) gelegt und alles mit einem 500 g Gewicht beschwert. Der Blot erfolgte für 2 h mit einer anschließenden Fixierung durch ein UV-Cross Linking (UV-Stratalinker 2400).

6 % Harnstoff Polyacrylamidgel	10	ml	Rotiphorese® NF-Acrylamid/ Bis-Lösung 30 % (29:1) (Roth)
	5	ml	10 x TBE
	21	g	Harnstoff
	400	µl	10 % APS
	20	µl	TEMED
	mit dH ₂ O auf 50 ml auffüllen		
10 x TBE	890	mM	Tris HCl
	890	mM	Borsäure
	20	mM	EDTA

Immunodetektion mit CDP-Star

Durch die Verwendung der DIG-markierten Fragmente konnten diese detektiert werden. Ein Anti-DIG Antikörper mit einer gekoppelten alkalischen Phosphatase bindet an die DIG markierten Bereiche und es kommt zum Umsatz des Substrats CDP Star und zur Entstehung von Chemilumineszenz. Hierzu wurde die Membran für 5 min in 150 ml Waschpuffer gewaschen und im Anschluss für 40 min in 150 ml Blockinglösung bei RT geschwenkt. Anschließend wurde die Membran für 30 min in 50 ml DIG-Antikörperlösung (1:10.000 in 1 x Blockinglösung) bei RT inkubiert. Im Anschluss daran folgten 4 Waschschrte mit je 150 ml Waschpuffer für 10 min um ungebundene Antikörperrückstände zu entfernen und eine 5 minütige Inkubation in 100 ml Detektionspuffer. Die CDP-Star Lösung wurde 1:200 in 6 ml Detektionspuffer verdünnt und tropfenweise auf die Membran verteilt. Die Membran wurde 60 min im Dunkeln gelagert und die Chemilumineszenz mittels eines Röntgenfilms detektiert. Der Röntgenfilm (Roche, Deutschland) wurde für 1 min, 5 min, 10 min und 30 min auf die Membran aufgelegt, entwickelt und digitalisiert.

Maleinsäurepuffer	100	mM	Maleinsäure
	150	mM	NaCl
	mit NaOH auf pH 7,5 einstellen		

Waschpuffer	3	ml	Tween 20
	1	l	Maleinsäurepuffer pH 7,5
Detektionspuffer	100	mM	Tris-HCl pH 9,5
	100	mM	NaCl
10 x Blockierungslösung	5	g	Blocking-Reagenz
	50	ml	Maleinsäurepuffer pH 7,5
DIG-Antikörperlösung	50	ml	1 x Blockinglösung
	5	µl	Anti-DIG
CDP-Star Lösung	5,94	ml	Detektionspuffer
	60	µl	CDP-Star

3.7.25 Kristallisationsexperimente mit dem Regulator RirA aus *D. shibae*

Um geeignete Kristallisationsbedingungen für das StrepII-RirA Protein aus *D. shibae* zu finden, wurden kommerziell erhältliche Kristallisationslösungen, sogenannte Screens verwendet. Diese Screens decken ein breites Spektrum an Puffersubstanzen, Fällungsmitteln, Salzen und pH-Werten ab. Die Kristallisationsansätze wurden nach dem *sitting drop* Verfahren (Abb. 14) in 96-Well *sitting drop* Platten (Intelli-Plate 96, Hampton Research, USA) mit den Screens von Nextal (Qiagen GmbH, Deutschland) durchgeführt. Es wurde der “The Cryos Suite”, “The JCSG Core I Suite” und der “The JCSG Core II Suite” von Nextal verwendet. In den 96-well Platten wurde jeweils 60 µl Reservoir vorgelegt. Anschließend wurden die Platten luftdicht verschlossen, in eine Anaerobenbox eingeschleust und dort über mehrere Tage durch mehrmaliges Öffnen anaerobisiert. Auf der höher liegenden Ebene der Platten wurden dann je Vertiefung 1 µl Proteinlösung und 1 µl Reservoirlösung zusammen pipettiert. Die Proteinlösung hatte eine Konzentration von entweder 8 mg/ml oder 10 mg/ml. Im dritten Well wurde der Proteinpuffer mit dem Fällungsmittel zusammen pipettiert. Die Platten wurden dann mit Folie luftdicht verschlossen und ohne Erschütterungen bei 17 °C gelagert. Die Entwicklung der Tropfen wurde mit einem Lichtmikroskop beobachtet und fotografiert.

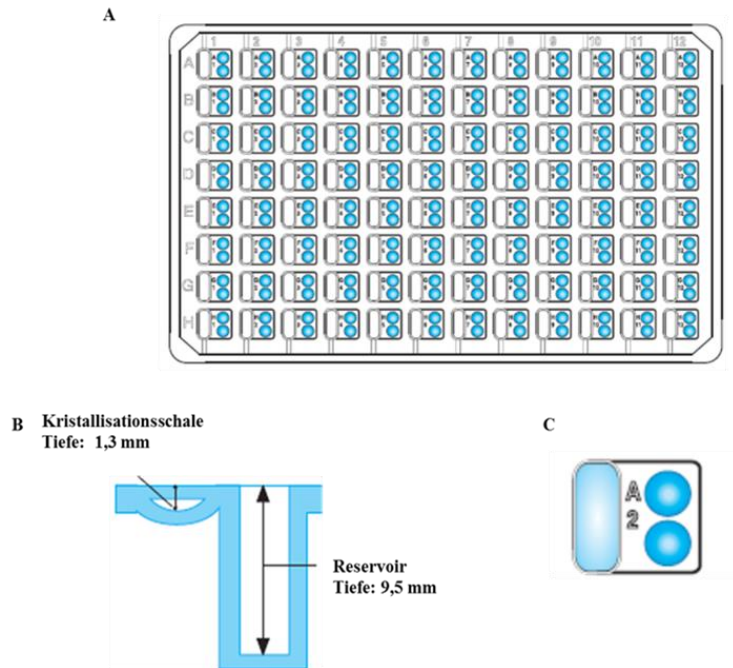


Abb. 14: Form einer verwendeten 96-Well-Platte nach dem „Sitting Drop“ Verfahren. Abb. A zeigt die 96-Well-Platte für Kristallisationsansätze nach dem „Sitting Drop“ Verfahren. In Abb. B ist der Querschnitt des Reservoirs für die Pufferlösungen sowie die Kristallisationsschale für den Kristallisationsansatz zu erkennen. Abb. C zeigt eine Aufsicht des Reservoirs und der zwei Kristallisationsschalen, in die der jeweilige Kristallisationsansatz pipettiert wurde. Hier können für jedes Fällungsmittel zwei verschiedene Proteinkonzentrationen getestet werden. (MRC 2 Well Crystallization Plate, Hampton Research, USA).

3.7.26 β -Galaktosidase Enzymtest

Für die Messung der β -Galaktosidase Aktivität in SWM-Medium von *D. shibae* Stämmen wurden entweder 250 μ l oder 500 μ l Zellen abgenommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, für 5 min bei 11.337 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Parallel dazu wurde die OD₅₇₈ der Kulturen bestimmt. Das Zellpellet wurde in 800 μ l Z-Puffer gelöst und 5 μ l Lysozym Lösung hinzugegeben. Das gelöste Pellet wurde für mindestens 30 min bei 37 °C und 200 rpm im Thermoblock inkubiert, bis sich das Pellet vollständig lysiert hatte und die Lösung klar wurde. Um die Reaktion zu starten wurden 200 μ l ONPG Lösung hinzugegeben. Bei Eintreten einer Gelbfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l 1 M Na₂CO₃ Lösung gestoppt und die Zeit bis zum Eintreten der Gelbfärbung notiert. Die Proben wurden im Anschluss erneut für 5 min bei 11.337 x g zentrifugiert und die OD₄₂₀ und OD₅₅₀ bestimmt. Die Enzymtests wurden jeweils in drei biologischen Replikaten durchgeführt, wobei bei jedem biologischen Replikat drei technische Replikate vermessen worden sind. Die Aktivität der β -Galaktosidase wird in Miller Units dargestellt (Miller, 1972).

Für die Berechnung der β -Galaktosidase Aktivität wurde folgende Formel verwendet:

$$U = \frac{1000 * A_{420} * (1,75 * A_{550})}{V * t * OD_{578}}$$

U	=	Miller Units
A ₄₂₀	=	Absorption des Reaktionsansatzes bei 420 nm
A ₅₅₀	=	Absorption des Reaktionsansatzes bei 550 nm
V	=	Volumen der Bakteriensuspension [ml]
T	=	Reaktionszeit [min]
OD ₅₇₈	=	Optische Dichte der Bakteriensuspension bei 578 nm

Z-Puffer	60	mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	40	mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
	10	mM	KCl
	1	mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	50	mM	β -Mercaptoethanol
Lysozym-DNase Lösung	7	mg/ml	Lysozym
	50	μ g/ml	DNase-Lösung
DNase Lösung	10	μ l/ml	Natriumacetat (3 M)
	25	mg/ml	DNase/bovine pancreas grade II
ONPG-Lösung	4	mg/ml	2-Nitrophenyl- β -Galactopyranosid

3.7.27 Aceton/Methanol Extraktion

Aus einer gut bewachsenen *D. shibae* Kultur (ca. 30 h) wurden Zellen mit einer OD₅₇₈ von 2,5 abgenommen, in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und für 10 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Aceton/Methanol Gemisch (7:2) resuspendiert (Megafuge 1.0 R, Rotor SLA 3.000, Heraeus). Die Suspension wurde im Dunkeln auf dem Taumelmischer für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 min bei 4.000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde in eine Quarzglasküvette (Schichtdicke: 10 mm) überführt und UV/Vis Spektren im Bereich von 200 nm bis 900 nm aufgenommen. Als Blank diente das Aceton/Methanol Gemisch (7:2).

4. Ergebnisse und Diskussion

Untersuchungen des eisenabhängigen Wachstumsverhaltens des *D. shibae* DFL12^T Wildtypstamms zeigte ein geringeres Wachstum in Abwesenheit von Eisen. Die Analyse der Genexpression ermöglicht es Gene zu identifizieren, die durch Eisenmangel induziert werden bzw. durch Eisenmangel reprimiert werden. Die Transkriptomanalysen wurden zum einen über DNA Arrayanalysen und zum anderen über RNA Sequenzierung durchgeführt.

4.1 *In vivo* Analyse der eisenabhängig regulierten Gene mittels Transkriptomanalysen

Für die Präparation der RNA wurde der *D. shibae* DFL12^T Wildtypstamm in Salzwasser Medium mit bzw. ohne Zugabe von 15 µM FeSO₄ kultiviert und bei einer OD₅₇₈ von 0,5 wurden die Zellen geerntet. Die RNA Aufreinigung erfolgte mit dem RNeasy Kit von Qiagen und die Qualitätskontrolle der RNA mit dem Bioanalyzer von Agilent. Die RNA Sequenzierung wurde in Kooperation mit dem G2L Labor (Universität Göttingen) durchgeführt. Für die DNA Array Analysen wurde die RNA direkt mit dem Cy3 Fluoreszenzfarbstoff markiert, fragmentiert, mit einem selbstdesignten Array hybridisiert und analysiert. Es wurden zwei unabhängige Arrayanalysen mit je 3 Replikaten durchgeführt (Ansatz 2 und 3) und mit einer dritten, früheren Arrayanalyse (Ansatz1; J. Jacobs, TU Braunschweig, unveröffentlichte Daten) verglichen.

Ein Vergleich der Transkriptmenge aus dem Wildtypstamm der ohne Eisen kultiviert wurde mit denen, bei denen Eisen zugegeben wurde, zeigten Gene der Eisenaufnahme, die unter Eisenmangel mit einem log₂ FC von bis zu 8,5 induziert waren. Der log₂ FC gibt die Änderung der Genexpression logarithmiert zur Basis 2 an.

Tabelle 14: Anzahl der Eisenmangel induzierten bzw. reprimierten Gene im *D. shibae* Wildtypstamm.

	WT + Fe / WT – Fe Ansatz 1	WT + Fe / WT – Fe Ansatz 2	WT + Fe / WT – Fe Ansatz 3
exprimiert	229	98	119
reprimiert	412	173	144

Als signifikant induziert zählten Gene ab einer Induktion mit einem $\log_2 \text{FC} \geq 0,8$. Für den Wildtyp Ansatz 1 wurden 229 Gene unter Eisenmangel als signifikant induziert gefunden. Für den Ansatz 2 waren es 98 Gene und für den Ansatz 3 wurden 119 Gene identifiziert (Tabelle 14). Als signifikant reprimiert zählten Gene mit einem $\log_2 \text{FC} \leq -0,8$. Unter Eisenmangel wurden in Ansatz 1 412 Gene, in Ansatz 2 173 Gene und in Ansatz 3 144 Gene als signifikant reprimiert identifiziert. In dieser Arbeit lag der Focus auf den unter Eisenmangel induzierten Genen. Da aus den Daten ersichtlich wird, dass es zu Abweichungen innerhalb der gemessenen Wildtypstämmen kam, wurden durch ein Venn Diagramm die Gene identifiziert, die in allen drei untersuchten Datensätzen des Wildtypstamms induziert waren. Das Venn Diagramm zeigt, dass in den drei gemessenen DNA Array Datensätzen des Wildtypstamms 59 Gene unter Eisenmangel induziert waren (Abb. 15). Eine Auflistung dieser Gene ist in der Tabelle 15 zu finden.

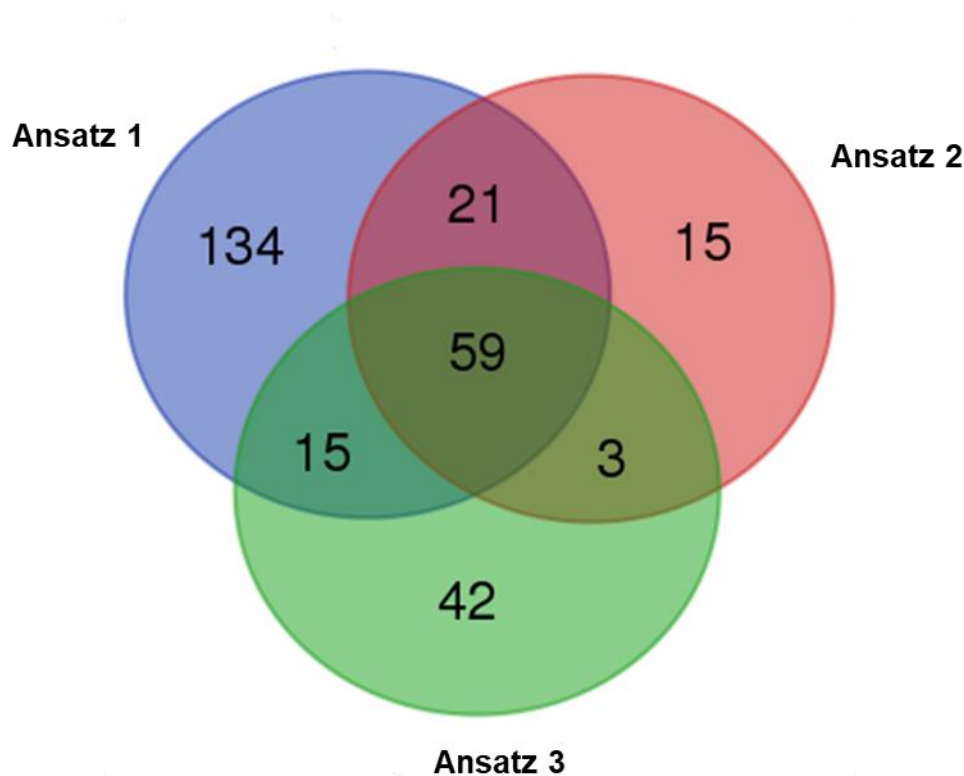


Abb. 15: Venn Diagramm der unter Eisenmangel induzierten Gene in drei gemessenen *D. shibae* Wildtyp Ansätzen. Ansatz 1 (blau) gibt den gemessenen Datensatz der unter Fe-Mangel induzierten Gene aus der Dissertation von Jenny Jacobs wieder (J. Jacobs, TU Braunschweig, unveröffentlichte Daten). Die Ansätze 2 (rot) und 3 (grün) wurden in dieser Arbeit aufgenommen. Schnittmengen sind durch überlappende Kreise gekennzeichnet.

Vergleichend zu den Arraydaten wurde eine RNA Sequenzierung durchgeführt. Hierzu wurde der *D. shibae* DFL12^T Wildtypstamm analog zu den DNA Array Experimenten kultiviert und die RNA mit dem RNeasy Kit von Qiagen präpariert und in Kooperation mit dem G2L Labor in Göttingen analysiert. Die Ergebnisse der RNA Sequenzierung für die 59 identifizierten Gene sind ebenfalls der Tabelle 15 zu entnehmen. Bei der RNA Sequenzierung werden alle Gene mit einem Wert höher als 1,5 als signifikant induziert angesehen. Die Ergebnisse der RNA Sequenzierung unterstützen die Ergebnisse der DNA Array Analysen. Die mit am stärksten induzierten Gene in der RNA Sequenzierung entsprechen den Genen der Eisenaufnahme die in einem Gencluster vorliegen. Die Transkriptomdaten aus den Arrayanalysen und der RNA Sequenzierung wurden mit Proteomdaten ergänzt, die bereits vorlagen (J. Jacobs, TU Braunschweig, unveröffentlichte Daten). Aus *D. shibae* Wildtypzellen, die mit bzw. ohne Zugabe von Eisen kultiviert wurden, wurde das Proteom der löslichen Zellfraktion durch LC-MS/MS Analyse ermittelt. Unterschiede in den Proteinmengen wurden verglichen und ein Induktionsfaktor ermittelt. Zum Teil wurden die Proteine nur unter Eisenmangel identifiziert und dann mit „*de novo*“ bezeichnet (Tabelle 15). Im Gegensatz zu den Transkriptomanalysen konnten in der Proteomanalyse nicht alle Proteine gefunden werden, deren Gene im Transkriptom unter Eisenmangel induziert waren. Dennoch sind viele Gene die im Transkriptom stark induziert sind unter Eisenmangel auch im Proteom gefunden worden.

Es wurden 13 Gene identifiziert, die für Proteine codieren, die an der Aufnahme von Eisen aus der Umgebung, für den Transport von Eisen in die Zelle oder der Bindung von Eisen beteiligt waren (Tabelle 15). Zusätzlich wurden 21 Gene identifiziert, deren codierenden Proteine an metabolischen Stoffwechselleistungen beteiligt waren und weitere 25 Gene, die für hypothetische Proteine codieren (Tabelle 15).

Besonders auffällig waren Gene, die für Proteine des Eisenstoffwechsels codieren, die in unmittelbarer Nachbarschaft liegen und mit einem log₂ FC von 2,25-6,53 am stärksten durch Eisenmangel induziert waren. Diese starke Induktion der benachbarten Gene in Genom lässt darauf schließen, dass diese Gene in einem Gencluster vorliegen (Abb. 16). Innerhalb dieses eisenabhängig regulierten Genclusters liegen auch einige Gene, die für hypothetische Proteine codieren, was darauf schließen lässt, dass diese ebenfalls am Eisenstoffwechsel beteiligt sind.

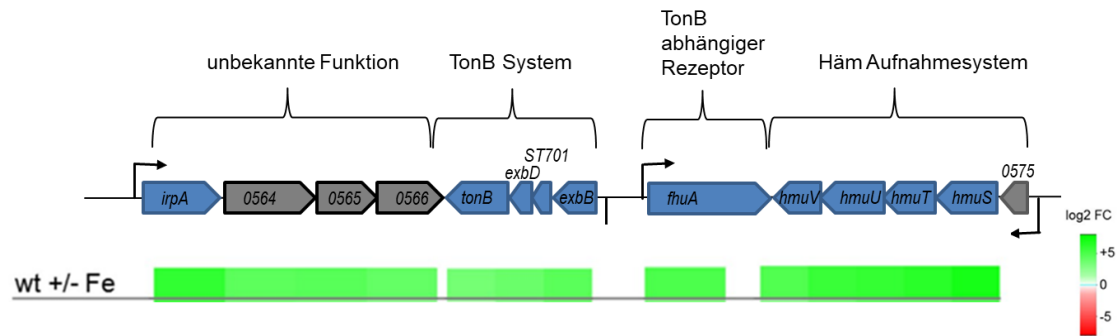


Abb. 16: Schematische Darstellung der Operonstruktur der mit am stärksten induzierten Gene im DNA Array. Annotierte Gene sind in blau gekennzeichnet, hypothetische in grau. Potentielle Transkriptstartpunkte sind durch Pfeile markiert. Eine Heatmapanalyse der Expressionsstärke unter Eisenmangel ist gezeigt.

Dieses eisenabhängige Gencluster besteht aus 3 Operons und 4 transkriptionellen Einheiten. Als Startgen des ersten Operons innerhalb des Genclusters war das „iron regulated protein“ *irpA* (*Dshi_0563*) zu finden, das für eine Peptidase codiert. Mit einem log2 FC von ca. 6 war es eins der am stärksten induzierten Gene unter Eisenmangel. Das *irpA* Gen wurde bereits in Bacterioidetes, Alphaproteobakterien und Cyanobakterien gefunden, wobei gezeigt werden konnte, dass es in Cyanobakterien am Wachstum unter Eisenmangel beteiligt ist (Reddy *et al.*, 1988). Im Anschluss an das *irpA* Gen folgten die drei Gene *Dshi_0564*, *Dshi_0565* und *Dshi_0566*, die für hypothetische Proteine codieren und mit einem log2 FC von ca. 3-4 exprimiert waren. Diese vier Gene bilden ein Operon und stehen wahrscheinlich unter der Kontrolle des *irpA* Promotors. Die Genabfolge dieses Operons ist innerhalb der Alphaproteobakterien hoch konserviert. Hieraus ergab sich, dass das Gen *Dshi_0564* für eine Thiol Reduktase oder ein Cytochrom codieren könnte. An der Position des Gens *Dshi_0565* ist in anderen Organismen oftmals eine Peptidase zu finden und an der Position des Gens *Dshi_0566* ein „twin-arginine translocation pathway signal“. Diese möglichen Komponenten des Operons weisen auf ein weiteres Transportsystem hin.

Das benachbarte Operon beginnt mit dem Gen *exbB*, welches für ein „Biopolymer transport protein“ codiert. Dieses Gen ist mit einem log2 FC von ca. 5 unter Eisenmangel exprimiert. Es folgen die Gene *ST701* und *exbD* (*Dshi_0568*), welche beide für Teile des „Biopolymer transport proteins“ ExbD codieren. Das Gen *exbD* weist einen log2 FC von ca. 3,5 auf, wobei die andere Untereinheit *ST701* in den Transkriptomdaten nicht zu finden war. Das Gen *Dshi_0567* codiert für ein „TonB family protein“ welches in der Membran mit dem ExbBD Komplex assoziiert vorliegt und an der Energiegewinnung durch

einen Protonengradienten beteiligt ist (Krewulak & Vogel, 2008). Das Gen *Dshi_0567* weist einen log2 FC von ca. 3 auf. Das TonB System untersteht wahrscheinlich der Kontrolle des *exbB* Promotors.

Das *fhuA* Gen (*Dshi_0570*) codiert für einen TonB abhängigen Rezeptor, der unter anderem für die Aufnahme von Fe^{3+} durch Bindung an Siderophore verantwortlich sein könnte (Braun, 2009). Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht bekannt, dass *D. shibae* in der Lage ist eigene Siderophore zu produzieren. Daher wäre es möglich dass FhuA beim Transport von Xenosiderophoren eine Rolle spielt. Dieses Gen weist unter Eisenmangel eine log2 FC Wert von ca. 5 auf.

Das letzte Operon des Genclusters beginnt mit dem Gen *Dshi_0575*, welches für ein hypothetisches Protein codiert. Das Gen *Dshi_0575* ist mit einem log2 FC von ca. 8 eins der am stärksten induzierten Gene unter Eisenmangel. Das nächste Gen der Operonstruktur ist *hmuS* (*Dshi_0574*), welches für ein „putative hemin transport protein“, welches das Häm degradiert, codiert und einen log2 FC von ca. 6,4 aufweist (Schwiesow *et al.*, 2018). Es folgen die Gene *hmuT* (*Dshi_0573*), *hmuU* (*Dshi_0572*) und *hmuV* (*Dshi_0571*). Diese Gene codieren für den ABC Transporter HmuTUV, der an der Aufnahme und dem Transport von Häm beteiligt ist. Dieses Häm Aufnahmesystem wird wahrscheinlich über den Promotor des Gens *Dshi_0575* gesteuert.

Weitere eisenassoziierte Gene, die eine Eisenmangelinduktion zeigten, waren die Gene *hemB2* (*Dshi_1017*) mit einem log2 FC von ca. 7, *Dshi_2688* mit einem log2 FC von ca. 2,5 und *Dshi_2304* sowie *Dshi_4223* jeweils mit einem log2 FC von ca. 1. Das *hemB2* Gen codiert für einen TonB abhängigen Häm/Hämoglobin Rezeptor und ist im Vergleich mit den anderen Gene eins der am höchsten induzierten Gene. Da das Gen *Dshi_1017* für einen zweiten TonB-abhängigen Rezeptor codiert, der ebenfalls unter Eisenmangel stark induziert ist, könnte auch dieser einer Rolle beim Hämin Aufnahmesystem spielen.

Das Gen *Dshi_2688* codiert für eine Cytochrom Ubiquinol Oxidase Untereinheit. Cytochrome sind in der Lage Häm zu binden. Aufgrund ihrer Fähigkeit den Redox Zustand des Fe-Zentralatoms vom Fe^{2+} in den Fe^{3+} Zustand und zurück zu unterstützen, sind sie in der Lage am Elektronentransport teilzunehmen (Miller & Gennis, 1983).

Das Gen *Dshi_2304* codiert für das „hemerythrin HHE cation binding domain containing protein“ und das Gen *Dshi_4223* codiert für ein „Ferritin Dps family protein“. Ferritine

sind in der Lage Häm unabhängig Eisen in seiner Fe^{3+} Form zu speichern (Chiancone *et al.*, 2004).

Tabelle 15: Unter Eisenmangel induzierte Gene des *D. shibae* DFL12^T Wildtypstamms aus drei unabhängigen Experimenten mit je 3 Replikaten. Die angegebenen Werte entsprechen dem log2 FC. Mit „*de novo*“ gekennzeichnete Proteine wurden nur unter Eisenmangel gefunden.

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe / WT-Fe (1)	WT+Fe / WT-Fe (2)	WT+Fe / WT-Fe (3)	RNA Seq	Pro- teom
Eisenstoffwechsel							
Dshi_0563	putative lipoprotein	<i>irpA</i>	6,45	5,57	6,08	6,47	<i>de novo</i> up
Dshi_0567	TonB family protein		2,25	2,44	3,55	6,77	
Dshi_0568	biopolymer transport protein ExbD/TolR	<i>exbD</i>	3,25	3,21	3,97	6,67	
Dshi_0569	MotA/TolQ/ExbB proton channel	<i>exbB</i>	5,34	4,34	4,52	6,87	
Dshi_0570	TonB-dependent receptor	<i>fhuA/fec</i> / <i>fepA</i> / <i>btuB</i>	5,20	5,45	5,08	7,42	<i>de novo</i> up
Dshi_0571	hemin importer ATP-binding sub-unit	<i>hmuV</i>	3,90	3,65	4,90	6,70	<i>de novo</i> up
Dshi_0572	transport system permease protein	<i>hmuU</i>	5,28	5,68	5,81	7,62	
Dshi_0573	periplasmic binding protein	<i>hmuT</i>	6,33	6,50	6,03	7,61	<i>de novo</i> up
Dshi_0574	hemin-degrading family protein	<i>hmuS</i>	6,29	6,53	6,40	7,64	<i>de novo</i> up
Dshi_1017	TonB-dependent heme/hemoglobin receptor family protein	<i>hemB</i>	7,29	7,37	5,20	6,94	<i>de novo</i> up
Dshi_2304	hemerythrin HHE cation binding domain containing protein		1,77	0,95	1,37	2,25	<i>de novo</i> up
Dshi_2688	cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit I		2,71	2,65	2,55	3,10	
Dshi_4223	Ferritin Dps family protein		1,42	0,98	1,43	1,93	<i>de novo</i> up

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe / WT-Fe (1)	WT+Fe / WT-Fe (2)	WT+Fe / WT-Fe (3)	RNA Seq	Pro- teom
metabolische Stoffwechselwege							
<i>Dshi_1043</i>	TRAP dicarboxylate transporter-DctP subunit		1,69	1,30	0,90	1,34	
<i>Dshi_1094</i>	Fis family transcriptional regulator		5,27	3,79	5,61	6,40	
<i>Dshi_1095</i>	aldehyde dehydrogenase		4,42	2,91	4,74	4,96	4,11
<i>Dshi_1453</i>	putative sulfonate/nitrate transport system substrate-binding protein	<i>ssuA2</i>	1,02	1,25	1,72	4,69	
<i>Dshi_1477</i>	Usg family protein		1,97	1,00	0,97	1,72	
<i>Dshi_1600</i>	antibiotic biosynthesis monooxygenase		1,39	1,58	1,25	2,03	
<i>Dshi_1807</i>	UspA domain-containing protein		1,41	1,04	0,81	1,17	
<i>Dshi_1808</i>	amino acid carrier protein		1,43	1,05	0,80	1,13	
<i>Dshi_1966</i>	dihydrolipoamide dehydrogenase	<i>lpdA</i>	1,38	1,47	1,59	2,66	2,60
<i>Dshi_1967</i>	dehydrogenase catalytic domain-containing protein	<i>aceF</i>	1,41	1,32	1,53	2,61	2,45
<i>Dshi_1968</i>	pyruvate dehydrogenase subunit E1	<i>aceE</i>	1,51	1,19	1,07	2,54	3,10
<i>Dshi_2021</i>	extracellular solute-binding protein		5,72	4,41	5,60	5,67	8,82
<i>Dshi_2460</i>	GPW/gp25 family protein		1,48	1,29	1,04	1,53	
<i>Dshi_2461</i>	PAAR repeat-containing protein		1,15	1,08	1,07	1,68	
<i>Dshi_2462</i>	Rhs element Vgr protein		1,27	1,07	1,18	1,62	
<i>Dshi_2464</i>	phage tail protein		1,84	1,30	1,38	1,58	<i>de novo</i> up
<i>Dshi_2465</i>	phage tail protein		1,76	1,34	1,16	1,50	1,66

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe / WT-Fe (1)	WT+Fe / WT-Fe (2)	WT+Fe / WT-Fe (3)	RNA Seq	Pro- teom
<i>Dshi_2467</i>	mucin-associated surface protein (MASP)		1,99	1,30	1,05	1,67	
<i>Dshi_2687</i>	pseudoazurin		5,49	6,36	4,06	8,16	
<i>Dshi_3218</i>	CRISPR- associated Cas5 family protein	<i>cas5</i>	0,87	1,08	0,90	1,12	<i>de novo up</i>
<i>Dshi_3685</i>	BioY protein		1,85	1,14	0,94	1,28	
hypothetische Proteine							
<i>Dshi_0487</i>	hypothetical protein		1,98	0,92	0,90	1,50	<i>de novo up</i>
<i>Dshi_0488</i>	hypothetical protein		1,85	0,95	0,92	1,56	
<i>Dshi_0564</i>	hypothetical protein		3,68	3,13	4,45	5,57	
<i>Dshi_0565</i>	hypothetical protein		3,62	3,12	4,62	5,07	<i>de novo up</i>
<i>Dshi_0566</i>	hypothetical protein		3,03	2,83	4,18	4,78	<i>de novo up</i>
<i>Dshi_0575</i>	hypothetical protein		7,23	8,10	7,10	8,16	<i>de novo up</i>
<i>Dshi_1018</i>	hypothetical protein		4,73	4,63	3,74	6,74	
<i>Dshi_1306</i>	hypothetical protein		1,83	1,17	0,82	1,36	
<i>Dshi_1558</i>	hypothetical protein		3,58	2,65	2,51	3,98	<i>de novo up</i>
<i>Dshi_1814</i>	hypothetical protein		7,00	7,63	5,83	8,04	
<i>Dshi_1995</i>	hypothetical protein		2,17	1,66	1,24	1,73	
<i>Dshi_2022</i>	hypothetical protein		4,76	4,01	4,95	5,31	<i>de novo up</i>
<i>Dshi_2050</i>	hypothetical protein		1,04	1,20	1,30	3,90	
<i>Dshi_2051</i>	hypothetical protein		7,06	6,78	5,76	7,61	<i>de novo up</i>
<i>Dshi_2052</i>	hypothetical protein		7,02	7,24	5,60	7,37	<i>de novo up</i>

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe / WT-Fe (1)	WT+Fe / WT-Fe (2)	WT+Fe / WT-Fe (3)	RNA Seq	Pro- teom
<i>Dshi_2457</i>	hypothetical protein		1,07	0,87	0,92	1,70	
<i>Dshi_2458</i>	hypothetical protein		1,45	1,08	0,97	1,60	<i>de novo up</i>
<i>Dshi_2463</i>	hypothetical protein		1,32	1,20	1,12	1,65	
<i>Dshi_2466</i>	hypothetical protein		2,35	1,60	1,36	1,74	
<i>Dshi_3069</i>	hypothetical protein		1,72	1,11	0,96	2,30	
<i>Dshi_3216</i>	hypothetical protein		1,09	0,82	0,80	1,13	<i>de novo up</i>
<i>Dshi_3684</i>	hypothetical protein		2,35	1,31	1,03	1,30	1,10
<i>Dshi_4222</i>	hypothetical protein		3,92	3,13	3,37	4,36	
<i>Dshi_4224</i>	hypothetical protein		5,28	3,54	5,07	5,60	
<i>Dshi_4225</i>	hypothetical protein		4,93	3,83	4,72	6,04	<i>de novo up</i>

4.1.1 Eisenabhängige Regulatoren in *D. shibae*

Um die eisenabhängige Genregulation zu steuern, werden Regulatoren benötigt. Die Genomannotation hat den ORF *Dshi_2142* als *fur* Gen und den ORF *Dshi_1011* als *irr* Gen identifiziert. Die Analyse blastp („Basic local alignment search tool“) bei der die Aminosäuresequenz des RirA Regulators aus *A. tumefaciens* gegen eine Proteindatenbank abgeglichen wurde, ergab eine Sequenzidentität von 40,7 % mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des ORF *Dshi_1660*. Der RirA Regulator gehört zur Familie der Rrf2 Transkriptionsfaktoren, die unterschiedliche Typen an Fe-S Cluster koordinieren können. In der Sequenz von *Dshi_1660* sind ebenfalls die hoch konservierten Cysteine zu finden, die in dem RirA Regulator aus *A. tumefaciens* relevant für die eisenabhängige Regulation sind (Abb. 17) (Bhubhanil *et al.*, 2014). Allerdings weist das Gen *Dshi_1660* auch eine hohe Homologie zum NsrR Regulator aus *B. subtilis* mit 39,7 % auf. Der NsrR Regulator ist ein NO-sensitiver Repressor, der z. Bsp. bei *B. subtilis* ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster koordiniert und das Flavohämoprotein Gen *hmp* sowie das Nitritreductase Gen *nasD* reprimiert (Nakano *et al.*, 2006).

Dshi_1660	MRLTTRTNLAMRTLMYCAVH-TGRNIRTSEVAKATNASENHLGQVINMLG	49
RirA	MRLTKQTNAYVRMLMYCAAN-EGHLSRIPEIARAYSVSEFLFKILQPLT	49
NsrR	MKLTNYTDYSLRVLI FLAAERPGELSNIKQIAETYSISKNHLMKVIYRLG	50
IscR	MRLTSKGRYAVTAMLDVALNSEAGPVPLADISERQGISLSYLEQLFSRLR	50
	*: **. :: : * . . : : . * . * : : *	
Dshi_1660	QTGFIETVRGRGGGIRLARN AQDITVGGVFRVFEAGTPFAECFDAKECTC	99
RirA	KAGLVETVRGRNGGVRLGKPATDISLFDVVRVTEDSFAMAE CFEDGVVEC	99
NsrR	QLGYVETIRGRGGGIRLGM DPEDINIGEVRKTEDDFNIVECFDANKNLC	100
IscR	KNGLVSSVRGPGGGYLLGKDASSIAVGEVISAVDESVDATRCQGGKG--C	98
	: * : : : ** . ** * . . . * : * . : . . . * *	
Dshi_1660	PLISVCR LK GALGEALMAFYRSLDAITLES L VKDNTGLKDLLGVEP----	145
RirA	PLVDSCGLNSALRKALNAFFDVLTEYSIDDLVKARPQINFLGLTDKDHK	149
NsrR	VISPVCGLKHVLNEALLAYLAVLDKYTLRDLVKNKEDIMKLLKMKE----	146
IscR	QGGDKCLTHALWRDLSDRLTGFLNNITLGELVNNQEVLDVSGRQHTHDAP	148
	* : . * : : . ** : . :	
Dshi_1660	-----VTAPA--	150
RirA	AI AKKPVVAAPAA-	162
NsrR	-----	
IscR	RTRTQDAIDVKLRA	162

Abb. 17: Alignment von Aminosäuresequenzen zur Identifikation des Proteins Dshi_1660. Das codierende Protein Dshi_1660 aus *D. shibae* (gi_159044209) wurde mit dem RirA Protein aus *A. tumefaciens* (RirA, gi_586948310; 40,7 % Identität), dem NsrR Protein aus *B. subtilis* (NsrR; WP_071576373; 39,7 % Identität), und dem IscR Regulator aus *E. coli* (IscR; gi_687677664; 24,1 % Identität) verglichen. Identische Aminosäurereste wurden mit Sternchen markiert und homologe Aminosäurereste mit Punkten. Hoch konservierte Cysteinreste sind gelb, Histidinreste orange markiert. Das Alignment wurde mit ClustalW2 generiert (Larkin *et al.*, 2007).

Aufgrund dieser Homologie ist es nicht auszuschließen, dass das Gen *Dshi_1660* anstelle des RirA Regulators auch für einen NsrR Regulator codieren könnte. NsrR besitzt ebenfalls die drei konservierten Cysteinreste und benötigt zur Koordination noch einen Histidinrest (Yukl *et al.*, 2008). Da die höhere Homologie des *Dshi_1660* Gens aber zum RirA aus *A. tumefaciens* zu finden ist, wird im weiteren Verlauf davon ausgegangen, dass das Gen für einen RirA Regulator codiert. Ein weiteres Mitglied der Rrf2 Familie ist IscR. Der IscR Regulator aus *E. coli* ist in der Lage ein [2Fe-2S] Cluster zu koordinieren und darüber den Gehalt an Eisen in der Zelle zu messen (Fleischhacker *et al.*, 2012). Hauptsächlich ist der IscR Regulator für die Regulation der Fe-S Cluster Biogenese verantwortlich (Schwartz *et al.*, 2001). Aufgrund der Sequenzanalyse ist auszuschließen, dass das Gen *Dshi_1660* für den IscR Regulator codiert, da nur eine Proteinsequenzhomologie von 24,1 % zu finden war.

Allerdings zeigten Genomanalyse von *D. shibae*, dass das Gen *Dshi_1633* für den IscR Regulator codieren könnte. Mit einer Homologie von 41,77 % weist es die höchste Iden-

tität mit dem IscR Regulator aus *E. coli* auf. Proteinsequenzvergleiche mit den Regulatoren RirA und NsrR zeigten deutlich geringere Homologien. Für die Regulatoren NsrR aus *B. subtilis* konnte nur eine Homologie von 25 % und mit dem RirA Regulator aus *A. tumefaciens* eine Homologie von 23,38 % gefunden werden. Der IscR Regulator aus *E. coli* koordiniert sein Fe-S Cluster über drei Cysteine und ein Histidin (Fleischhacker *et al.*, 2012). In der codierenden Proteinsequenz von *Dshi_1633* fehlen diese relevanten Aminosäuren, die für die Koordination des Fe-S Cluster benötigt werden (Abb. 18).

NsrR	MKLNTYTDYSLRVLIFLAAERPGEISLNKQIAETYSISKNHLMKVIYRLGQLGYVETIRG	60
RirA	MRLTKQTNAYVRMLMYCA-ANEGKLSRIPEIARAYGVSEFLFKILQPLNKAGLVETVRG	59
Dshi_1633	MKLSTKGRYAMVAMADLAEPADKLVTLSEIAERQSIISLTYLEQLFVKLRRAKLVESVRG	60
IscR	MRLTSKGRYAVTAMLDVALNSEAGPVPLADISERQGISLSYLEQLFSRLRKNGLVSSVRG	60
	:. . *:: : * : :*. . :.* .* :: : * : *. :.*	
NsrR	RGGGIRLGMPEDINIGEVVRKTEDDFNIVECFDANKNLCVIS--PVCGLKHYLNEALLA	118
RirA	RNGGVRLGKPAEKISLFDVVKVTEDSFAMAECFEDGAVECPLV--DSCGLNSALRKALNA	117
Dshi_1633	PGGGYRLARAPDAIRVSDVLQAVDETVSAMHTGAG-ASGAKSGSRAQS-MTNRLWEGLSA	118
IscR	PGGGYLLGKDASSIAVGEVISAVDESVDATRCQ-G-KGGCQGG--DKC-LTHALWRDLSD	115
	.** * . * : :*: .: *	
NsrR	-YLAVLDKYTLRDLVKNKEDIMKLLKMK--E-----	146
RirA	-FFDVLAEYSIDDLVKARPQINFLLGID--TEMPKIAALPAA-----	156
Dshi_1633	HVYVFLHQTRLSDVVTNQLTPCPAVPTLFTVVDDVDDADAVAN----	162
IscR	RLTGFLNNITLGELVNNQEVLDVSGRQH-THDAPRTRTQDAIDVKLRA	162
	.* : : :*. :	

Abb. 18: Alignment von Aminosäuresequenzen zur Identifikation des Proteins Dshi_1633. Das codierende Protein Dshi_1633 aus *D. shibae* (gi_159044182) wurde mit dem RirA Protein aus *A. tumefaciens* (RirA, gi_586948310; 23,38 % Identität), dem NsrR Protein aus *B. subtilis* (NsrR; WP_071576373; 25 % Identität), und dem IscR Regulator aus *E. coli* (IscR; gi_687677664; 41,77 % Identität) verglichen. Identische Aminosäurereste wurden mit Sternchen markiert und homologe Aminosäurereste mit Punkten. Hoch konservierte Cysteinreste sind gelb, Histidinreste orange markiert. Das Alignment wurde mit ClustalW2 generiert (Larkin *et al.*, 2007).

Aber es wurde für den IscR Regulator aus *R. sphaeroides*, welcher eine 68,9 %ige Identität mit dem IscR aus *D. shibae* aufweist, bereits gezeigt, dass es an der eisenabhängigen Genregulation beteiligt ist (Remes *et al.*, 2015). Dem IscR Regulator aus *R. sphaeroides* fehlen die Cysteinreste ebenfalls.

Anhand dieser Proteinsequenzanalysen konnten neben der bereits bekannten Regulatoren Fur und Irr auch Gene, die für die potentiellen Regulatoren RirA und IscR codieren, identifiziert werden. Das Vorhandensein dieser vier potentiellen eisenabhängigen Regulatoren, die an der Anpassung an Eisenmangel beteiligt sein könnten, wurde bislang noch in keinem anderen Organismus gefunden. Um den Einfluss dieser Regulatoren auf die Anpassung an Eisenmangel näher zu untersuchen, ist es wichtig zu identifizieren in welcher Weise Eisen gebunden werden kann und welche Kofaktoren beteiligt sind, die es ermöglichen den Gehalt an Eisen in der Zelle messen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden

die Kofaktoren für den RirA Regulator sowie den IscR Regulator identifiziert und näher charakterisiert.

4.2 Funktionelle *in vitro* Untersuchung des eisenabhängigen Regulators RirA aus *Dinoroseobacter shibae*

4.2.1 Heterologe Produktion von *D. shibae* RirA

Der Transkriptionsregulator RirA aus *Dinoroseobacter shibae* ist in der Zelle nur in geringen Mengen vorhanden. Um ausreichende Mengen an RirA Protein für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurde das *rirA*-Gen unter die Kontrolle eines induzierbaren Promoters gestellt und heterolog in *Escherichia coli* exprimiert. Hierzu wurde das Plasmid pET52b verwendet, in dem die Expression des *rirA* Gens über einen IPTG induzierbaren T7-Promoter reguliert wird. Der Vektor ermöglicht die Produktion von RirA mit einem N-terminal fusionierten StrepII-Affinitätstag, der eine spezifische Reinigung über eine Säulenchromatographie zulässt. Durch die Produktion als StrepII Fusionsprotein ist eine Reinigung mit Strep-Tactin®, welches eine modifizierte Form des Streptavidin darstellt und kovalent an eine Agarose-Matrix gebunden ist, möglich. Hierdurch konnte eine effiziente Reinigung des RirA Proteins aus der Cytoplasmafraktion der produzierenden *E.coli* BL21CD+(DE3)-RIL Zellen stattfinden. Durch die vorhandene PreScission Schnittstelle zwischen dem StrepII-Tag und RirA kann der Affinitätstag an der Erkennungssequenz Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro zwischen Gln und Gly abgeschnitten und anschließend abgetrennt werden. Das so produzierte StrepII-RirA Fusionsprotein hat eine molekulare Masse von ca. 18 kDa. Nach der Abtrennung des acht Aminosäuren langen StrepII-Tags, weist das RirA Protein nur noch eine molekulare Masse von ca. 16 kDa auf.

Um geeignete Produktionsbedingungen für RirA zu finden wurden Expressionstests durchgeführt, bei denen neben der Menge an IPTG auch die Temperatur für das Wachstum der produzierenden *E. coli* Zellen variiert wurde. Hierzu wurden jeweils 100 ml einer *E.coli* BL21CD+(DE3)-RIL Kultur, in welche zuvor das pET52b*rirA* Plasmid transformiert wurde, mit einer OD₅₇₈ von 0,05 aus einer über Nacht Kultur inokuliert, bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 100 µM, 200 µM oder 300 µM IPTG induziert. Im Anschluss wurden die Kulturen für ca. 16 h bei 180 rpm und 17 °C, 25 °C bzw. 30 °C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 16 h nach Induktion mit IPTG wurden jeweils Proben entnommen. Nach Lyse der Zellen wurden die Zellextrakte durch Zentrifugation

in die lösliche, cytosolische Fraktion und die unlösliche Zellfraktion unterteilt (Abb. 19). Anschließend wurden die Proteine über eine SDS PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt und durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht. Ein Vergleich der Banden vor (Abb. 19, Spur 1 und 7) und nach Induktion mit IPTG (Abb. 19, Spur 2-5 und 8-12) zeigt, dass eine induzierte Bande mit der relativen molekularen Masse von ca. 18 kDa zu erkennen ist. Das entspricht der errechneten Größe von 18,53 kDa des StrepII-RirA Fusionsproteins. Diese RirA Bande konnte in unterschiedlichen Stärken in Pellet und Überstand gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass produziertes RirA Protein in der Pellet Fraktion verloren geht, da nur aus der löslichen Fraktion gereinigt werden kann. Bei den Produktionen bei 17 °C war bei den IPTG Konzentration von 100 µM und 200 µM in der löslichen Fraktion eine leichte Bande auf Höhe des Fusionsproteins ab 2 h nach Induktion zu erkennen. Bei der Induktion mit 300 µM war diese Bande erst nach 5 h zu erkennen. Die Produktion von StrepII-RirA bei 17 °C nahm mit zunehmender IPTG Konzentration ab. Die Produktion mit 100 µM IPTG war bei 17 °C am erfolgreichsten. Nach 16 h war die stärkste Bande in der löslichen Fraktion für das StrepII-RirA Protein zu erkennen (Abb. 19). Bei der Produktion bei 25 °C war nach Induktion mit 100 µM IPTG nach 2 h nur eine schwache Bande bei ca. 18 kDa zu erkennen. Mit zunehmender Produktionsdauer blieb die Bandenstärke konstant (Abb. 19). Nach der Induktion mit 200 µM IPTG bei 25 °C war für die Dauer der Produktion bis zu 16 h nahezu keine RirA Banden zu erkennen. Bei einer Induktion mit 300 µM IPTG war bereits nach 2 h in der löslichen Zellfraktion deutliche Banden bei ca. 18 kDa zu erkennen. Mit steigender Menge an IPTG wird die RirA Produktion erhöht. Allerdings wurde auch der Anteil an RirA in der unlöslichen Proteinfraction deutlich höher verglichen mit 100 µM und 200 µM IPTG. Die Menge an produziertem StrepII-RirA Protein nahm zudem über die Zeit ab. Daher scheint die Induktion mit 100 µM IPTG bei einer Produktionstemperatur von 25 °C die geeignetste Bedingung zu sein. Bei 30 °C Wachstumstemperatur wurden die höchsten Mengen an RirA Protein in allen Pellet Fraktionen und bei allen drei IPTG Konzentrationen gefunden. Allerdings wurde gleichzeitig ein sehr geringer Anteil an RirA Protein in der löslichen Fraktion gefunden. Durch die hohe Temperatur bei der Produktion scheint die korrekte Faltung des RirA Proteins beeinträchtigt zu sein, sodass es aggregiert und dadurch unlöslich ist.

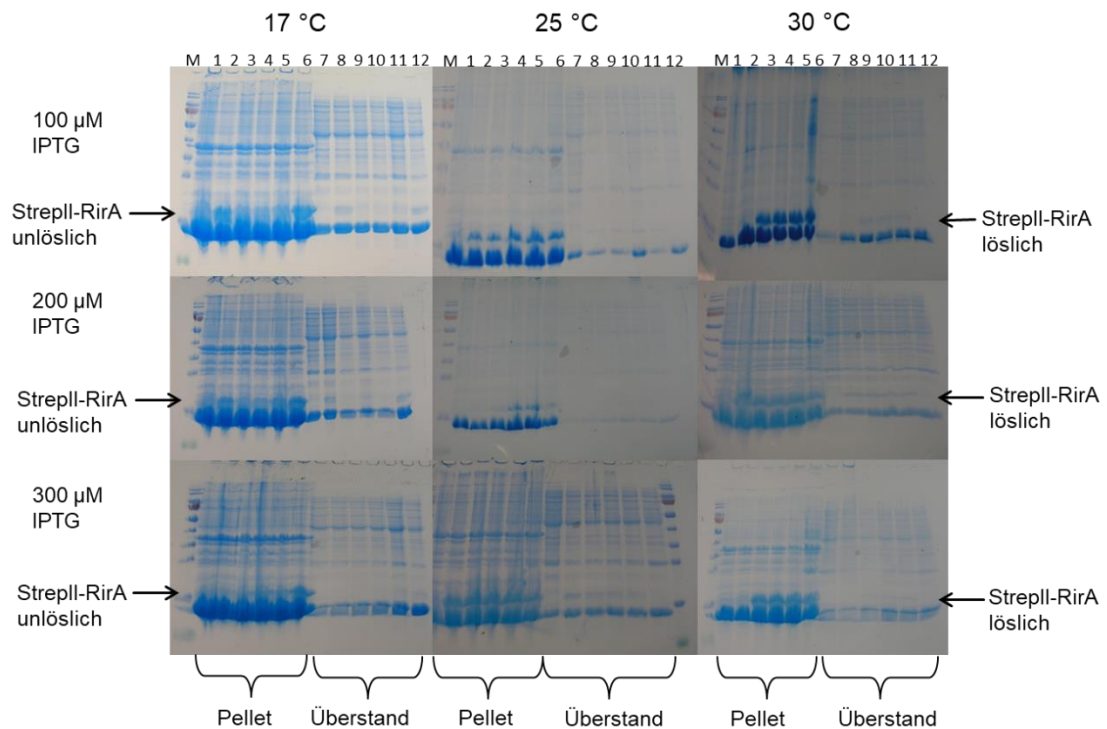


Abb. 19: Die Produktion von StrepII-RirA in *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL Zellen nach Induktion mit verschiedenen IPTG Konzentrationen bei verschiedenen Temperaturen. Die Produktion von StrepII-RirA wurde entweder mit 100 μ M, 200 μ M oder 300 μ M IPTG induziert und anschließend bei 17 °C, 25 °C oder 30 °C durchgeführt. Zellpellets einer OD₅₇₈ von 2 entsprechend wurden nach der Lyse in unlösliche Pellet Fraktionen und löslichen Überstand getrennt, auf einer 15 % SDS PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Spuren 1 bis 6 aller SDS Gele zeigen jeweils die unlöslichen Pellet Fraktionen und die Spuren 7 bis 12 zeigen die cytoplasmatischen, löslichen Fraktionen vom Überstand. Die StrepII-RirA Produktion wurde entweder mit 100 μ M IPTG, 200 μ M IPTG oder 300 μ M IPTG induziert. Die anschließende Produktion erfolgte entweder bei 17 °C, 25 °C oder 30 °C. Die Spuren 1 und 7 zeigen den Rohextrakt vor der Induktion. Die Spuren 2 und 8 zeigen jeweils die Proteinproduktion nach 2 h, die Spuren 3 und 9 nach 3 h, die Spuren 4 und 10 nach 4 h, die Spuren 5 und 11 nach 5 h und die Spuren 6 und 12 nach 16 h. Als Marker wurde der Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts) verwendet. Die Pfeile bei ca. 18 kDa markieren sowohl das unlösliche als auch das lösliche StrepII-RirA Protein.

Zur eindeutigen Identifizierung der 18 kDa Bande als produziertes StrepII-RirA Fusionsprotein wurden die Proben der Produktion bei 17 °C und 25 °C nach Induktion mit 100 μ M IPTG auf einer SDS PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF Membran geblottet. Der anschließende Westernblot mit einem spezifischen Strep-Tactin® AP Konjugat mit gekoppelter alkalinen Phosphatase detektierte die induzierte Bande bei ca. 18 kDa als StrepII-tag Protein. Bei den Westernblot Analysen wurde deutlich, dass die Ausbeute an StrepII-RirA bei 25 °C in der unlöslichen sowie in der löslichen Fraktion um einiges höher war im Vergleich zur Produktion bei 17 °C.

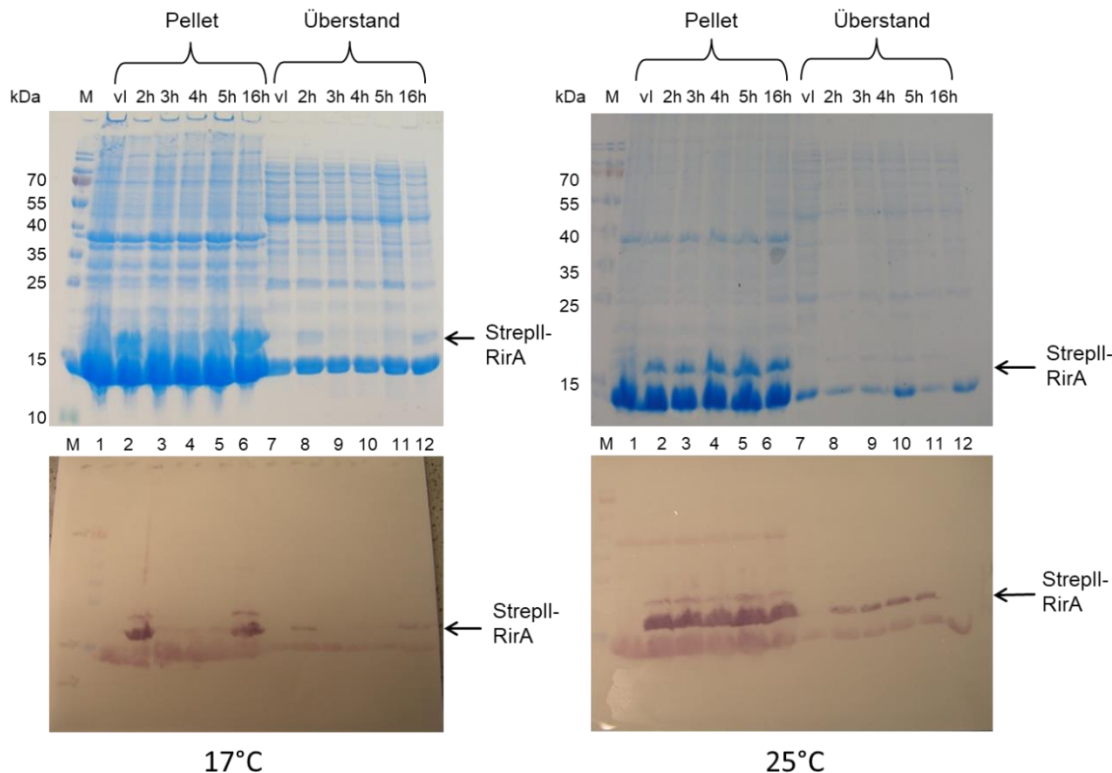


Abb. 20: Westernblotanalysen von produziertem StrepII-RirA in *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL Zellen nach Induktion mit 100 μ M IPTG bei 17 °C und 25 °C. Zellpellets einer OD₅₇₈ von 2 entsprechend wurden nach der Lyse in unlösliche Pellet Fraktionen und löslichen Überstand getrennt, auf einer 15 % SDS PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Für den Westernblot wurden nach der gelelektrophoretischen Größenfraktionierung die Proteinfractionen auf eine PVDF Membran mittels Semidry-Blot transferiert und mit einem Strep-Tactin® Konjugat mit gekoppelter alkalischer Phosphatase visualisiert. Die Spuren 1 bis 6 der SDS Gele und der Westernblot Membranen zeigen jeweils die unlöslichen Pelletfraktionen und die Spuren 7 bis 12 zeigen die cytoplasmatischen, löslichen Fraktionen vom Überstand. Die StrepII-RirA Produktion wurde mit 100 μ M IPTG induziert und das StrepII-RirA Protein bei 17 °C und 25 °C produziert. Die Spuren 1 und 7 zeigen den Rohextrakt vor der Induktion. Die Spuren 2 und 8 zeigen jeweils die Proteinproduktion nach 2 h, die Spuren 3 und 9 nach 3 h, die Spuren 4 und 10 nach 4 h, die Spuren 5 und 11 nach 5 h und die Spuren 6 und 12 nach 16 h. Als Marker wurde der Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts) verwendet. Die Molekularmassen der aufgetrennten Markerproteine sind angegeben. Die Pfeile bei ca. 18 kDa markieren sowohl das lösliche StrepII-RirA Protein in den SDS Gelen als auch das lösliche StrepII-RirA Protein auf der Westernblot Membran.

Für alle weiteren Experimente wurden die *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL Zellen nach der Induktion mit 100 μ M IPTG bei 25 °C inkubiert.

4.2.2 Affinitätschromatographische Reinigung des eisenabhängigen Regulators RirA aus *D. shibae*

Für RirA aus *D. shibae* wurde ein eisenhaltiger Kofaktor postuliert, der es dem Regulator ermöglicht Eisenmengen in der Zelle zu detektieren. Als Kofaktor wurde ein Fe-S Cluster angenommen. Da Fe-S Cluster oft Sauerstoff labil sind, wurde die Reinigung von *D. shibae* RirA unter anaeroben Bedingungen durchgeführt.

Zur Produktion des StrepII-RirA Fusionsproteins wurden 2 L LB Medium mit einer *E. coli* Vorkultur BL21CD+(DE3)-RIL mit dem Plasmid pET52b*rirA* mit einer Start OD₅₇₈ von 0,05 inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 angezogen. Die Induktion erfolgte mit 100 µM IPTG und die weitere Inkubation bei 180 rpm und 25 °C für ca. 20 h. Vor der eigentlichen Zellernte wurden die Kulturen zum Anaerobisieren für 2 h unter N₂ Atmosphäre in einem Anaerobenzelt gelagert. Alle folgenden Schritte wurden unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt. Nach der Zellernte durch Zentrifugation, dem Zellaufschluss mittels French Press und der Trennung von löslichen und unlöslichen Zellfragmenten in der Ultrazentrifuge, wurde die lösliche Cytoplasmatische Fraktion über eine Strep-Tactin®-Tropfsäule (IBA BioTAGnology, Göttingen, Deutschland) mit einem Säulenvolumen von 2 ml gereinigt. Das gebundene Fusionsprotein wurde mit 2,5 mM d-Desthiobiotin eluiert, da das Desthiobiotin mit dem StrepII-Tag um die Bindestellen konkurriert. Der Erfolg der Produktion und Reinigung wurde mittels einer 15 %igen SDS PAGE und anschließender Färbung mit Coomassie Brilliant Blue dokumentiert.

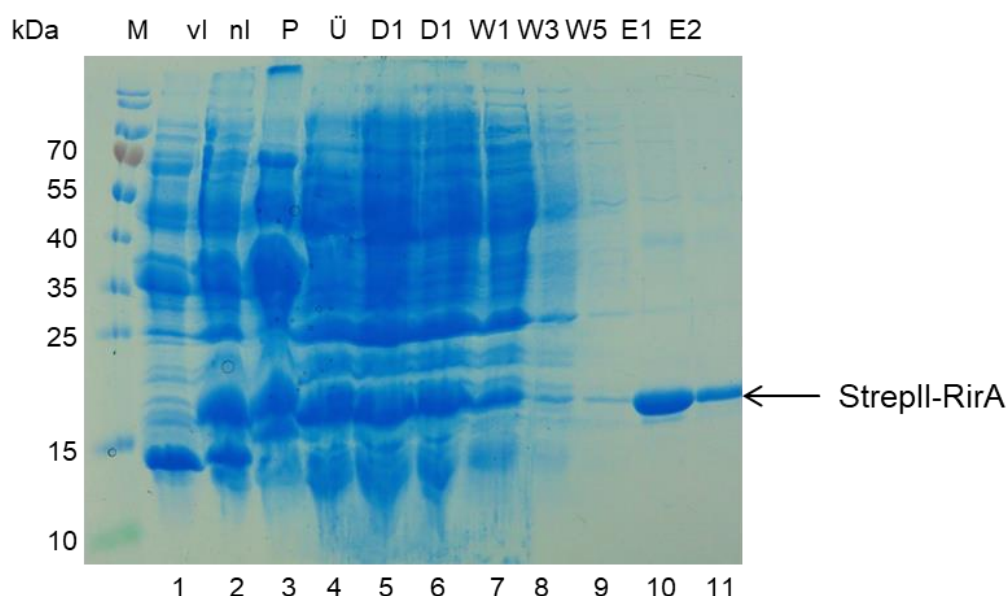


Abb. 21: Heterologe Produktion und anaerobe Reinigung des StrepII-RirA Fusionsproteins. In der Spur M ist der Marker Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts) aufgetragen. Spur 1(vI) zeigt den Rohextrakt des *E. coli* Expressionsstammes vor Induktion der StrepII-RirA Produktion. Spur 2 (nI) zeigt den Rohextrakt des StrepII-RirA Proteins 16 h nach Induktion mit 100 µM IPTG. In Spur 3 (P) ist die unlösliche Zellfraktion, in Spur 4 (Ü) die lösliche, cytoplasmatische Zellfraktion nach der Lyse der Produktionszellen zu sehen. Spur 5 (D1) zeigt den Durchfluss der Säule und somit die Menge an ungebundenem Protein. In Spur 6 (D2) ist der zweite Durchfluss der Säule zu sehen. Spur 7 (W1), 8 (W3) und 9 (W5) zeigen die unterschiedlichen Waschschritte, bei denen ungebundene Proteine von der Säule gewaschen wurden. In den Spuren 10 (E1) und 11 (E2) sind die Elutionsfraktionen des StrepII-RirA Proteins zu finden. Die Proteinfractionen wurden zur gelelektrophoretischen Größenfraktionierung auf einer 15 % SDS

Page aufgetragen und mit Commassie Brilliant Blue visualisiert. Die molekulare Masse der Markerproteine ist angegeben und der Pfeil markiert das StrepII-RirA Protein mit einer molekularen Masse von ca. 18 kDa.

Vor der Induktion mit IPTG konnte erwartungsgemäß kein StrepII-RirA Fusionsprotein im Zellextrakt detektiert werden (Abb. 21, Spur 1). Nach der Inkubation für 20 h ist deutlich eine verstärkte Bande bei ca. 18 kDa zu erkennen, die dem StrepII-RirA Fusionsprotein entspricht (Abb. 21, Spur 2). Nach dem Zellaufschluss mittels French Press waren ca. 50 % des RirA Proteins in der unlöslichen und ca. 50 % in der löslichen Fraktion zu finden waren (Abb. 21, Spur 3 und 4). In den Durchflussfraktionen konnte ebenfalls eine deutliche RirA Bande erkannt werden. Dies zeigte, dass das Säulenmaterial bereits mit gebundenem RirA Protein gesättigt war und dadurch größere Mengen an RirA Protein nicht mehr binden konnten und im Durchfluss verloren gingen (Abb. 21, Spur 5 und 6). Mit zunehmender Anzahl an Waschschritten wurden unspezifisch gebundene Proteine und geringe Mengen von RirA Protein von der Säule gewaschen (Abb. 21, Spur 7-9). Die Elution erfolgt mit 2,5 mM Desthiobiotin in 2 Schritten. Im ersten Schritt wurden 4 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und für 30 Minuten inkubiert (Abb. 21, Spur 10). Im zweiten Elutionsschritt wurden nochmals 2 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben, für 15 Minuten inkubiert und anschließend eluiert (Abb. 21, Spur 11). Das gereinigte StrepII-RirA Fusionsprotein zeigt einen hohen Reinheitsgrad von ca. 85-90 % und die erwartete molekulare Masse von ca. 18 kDa bei einer Konzentration von 2 mg/ml.

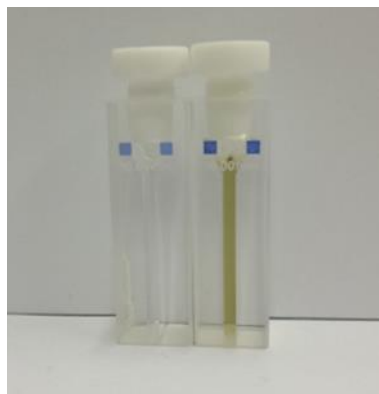


Abb. 22: Vergleich Puffer und anaerob gereinigtes StrepII-RirA. In den UV/Vis Küvetten befindet sich zum einen der farblose Puffer links und rechts das anaerob gereinigte und eluierte StrepII-RirA Protein. Die bräunliche Färbung ist charakteristisch für Fe-S Cluster koordinierende Proteine.

Das gereinigte StrepII-RirA Fusionsprotein zeigte eine deutliche Braunfärbung im Vergleich zum verwendeten Elutionspuffer (Abb. 22). Diese Färbung ist ein erster Hinweis darauf, dass RirA einen eisenabhängigen Kofaktor binden kann, da diese Braunfärbung häufig bei Proteinen auftritt, die ein Eisen-Schwefel Cluster als Kofaktor gebunden haben.

4.2.3 Spektroskopische Untersuchung des eisenabhängigen Kofaktors

Die in Proteinen enthaltenen Peptidbindungen und Seitenketten der einzelnen Aminosäuren absorbieren im ultravioletten Licht (UV). Proteine, die prosthetische Gruppen oder Kofaktoren enthalten, können Absorptionen im sichtbaren Bereich (Vis) zeigen. Durch die Bindung eines Kofaktors kann es daher zu Veränderungen im UV/Vis Spektrum kommen (Holtzhauer, 1996). Diese Absorptionsänderung in Richtung höherer Wellenlängen wird als bathochromer Effekt bezeichnet.

Die auffällige bräunliche Färbung des gereinigten RirA Proteins deutet auf einen Fe-S Cluster als Kofaktor hin. Fe-S Cluster zeigen in der UV/Vis Spektroskopie charakteristische Absorptionen im Bereich von 410 nm bis 420 nm. Um zu ermitteln, ob der RirA Regulator aus *D. shibae* solch ein Fe-S Cluster koordinieren kann, wurden UV/ Vis Messungen mit gereinigtem StrepII-RirA Protein durchgeführt.

Das bei 25 °C produzierte und anaerob gereinigte RirA Protein zeigt in der UV/Vis Spektroskopie eine deutliche Schulter bei ca. 410 nm (Abb. 23, blaue Kurve). Diese Absorption bei ca. 410 nm spricht eindeutig für einen Eisen assoziierten Kofaktor, der an das RirA Protein gebunden ist.

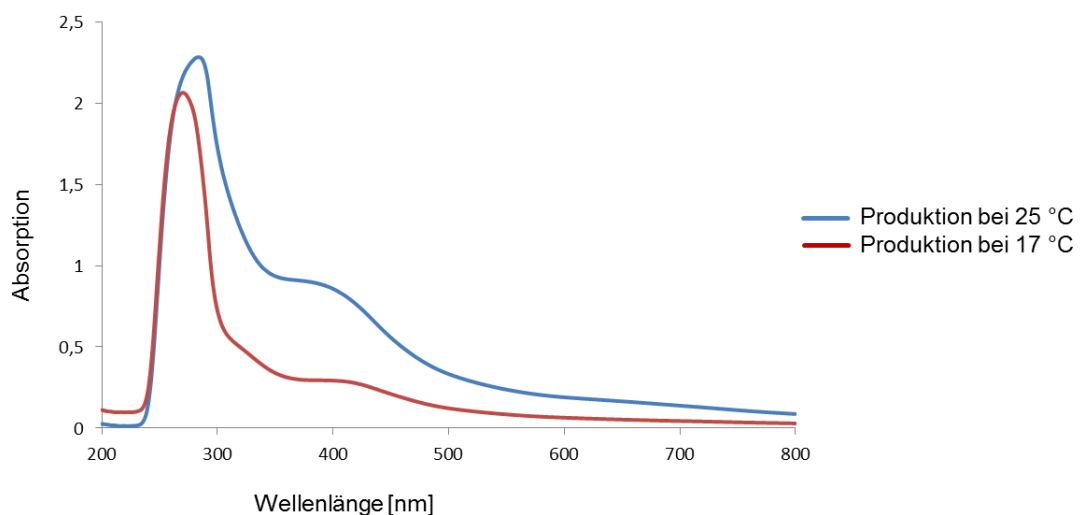


Abb. 23: Vergleich der StrepII-RirA Produktionen bei 17 °C und 25 °C. Das StrepII-RirA Protein wurde bei 17 °C und 25 °C produziert, anaerob gereinigt und spektroskopisch im UV/Vis vermessen. Die blaue Kurve zeigt die Produktion bei 25 °C und die rote Kurve die Produktion bei 17 °C.

Da bei den vorangegangenen Westernblotanalysen gezeigt werden konnte, dass das StrepII-RirA Fusionsprotein auch bei 17 °C löslich produziert werden konnte (Abb. 20),

wurde auch unter diesen Bedingungen eine Proteinproduktion durchgeführt. Bereits bei der anaeroben Reinigung war zu erkennen, dass das RirA Protein nur eine sehr schwache Braunfärbung aufwies im Vergleich zum StrepII-RirA Protein, welches bei 25 °C produziert worden ist. Die UV/Vis Experimente des bei 17 °C produzierten RirA Proteins zeigten, dass neben der schwächeren Braunfärbung des Proteins, auch eine starke Reduktion in der Absorption bei ca. 410 nm im Vergleich zur Produktion bei 25 °C (Abb. 23) zu erkennen war. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Produktion nur noch bei 25 °C durchgeführt.

Um den Einfluss von Sauerstoff auf das Fe-S Cluster zu untersuchen, wurde das anaerob gereinigte RirA Protein für 60 min, 120 min und 24 h Luftsauerstoff ausgesetzt und jeweils UV/Vis Spektren aufgenommen.

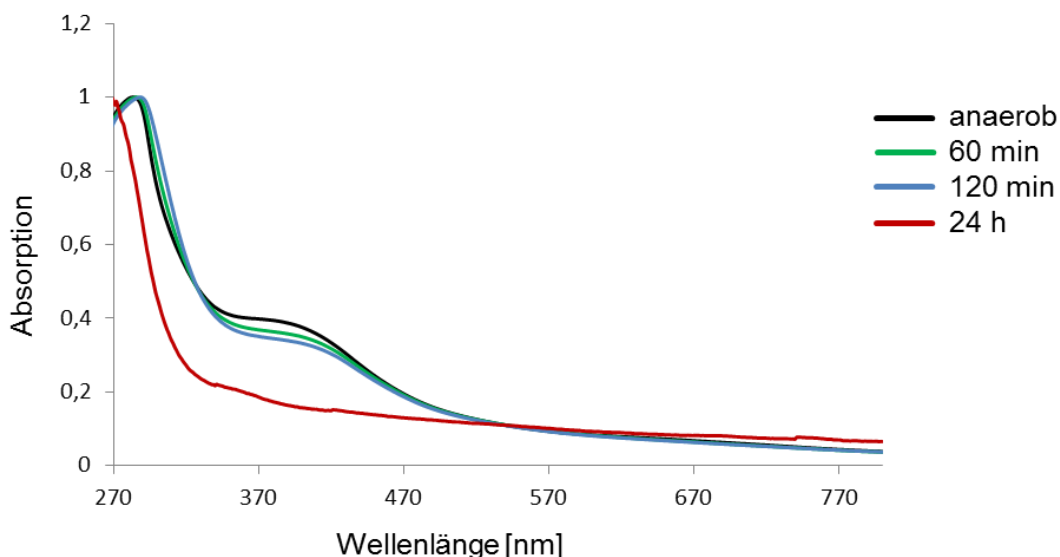


Abb. 24: Zerfall des Fe-S Clusters durch Sauerstoffexposition im zeitlichen Verlauf einer UV/Vis Messung. Das anaerob gereinigte StrepII-RirA Protein wurde über einen Zeitraum von 24 h Luftsauerstoff ausgesetzt. Die schwarze Kurve zeigt das Spektrum des anaeroben StrepII-RirA Proteins, die grüne Kurve nach Exposition mit Luftsauerstoff für 60 min, die blaue Kurve nach Exposition mit Luftsauerstoff für 120 min und die rote Kurve das Spektrum nach Exposition mit Luftsauerstoff für 24 h.

Das anaerob gereinigte StrepII-RirA Fusionsprotein zeigt im UV/Vis Spektrum die charakteristische Schulter bei ca. 410 nm (Abb. 24, schwarze Kurve). Nach 60 minütiger Exposition mit Luftsauerstoff (Abb. 24, grüne Kurve) nimmt die Absorption bei ca. 410 nm ab. Mit zunehmender Expositionsdauer (Abb. 24, blaue Kurve) wird die Absorption bei ca. 410 nm weiter verringert, bis die Absorption nach 24 h (Abb. 24, rote Kurve) komplett verschwunden ist. Dies deutet darauf hin, dass das Fe-S Cluster an Luftsauerstoff zerfällt und somit Sauerstoff labil ist. Sauerstofflabile Fe-S Cluster sind bereits aus

anderen transkriptionellen Regulatoren wie dem Fnr (fumarate and nitrate reductase) Regulator aus *B. subtilis*, dem IscR Regulator aus *E. coli* oder dem VnfA Regulator aus *A. vinelandii* bekannt (Gruner *et al.*, 2011; Fleischhacker *et al.*, 2012; Nakajima *et al.*, 2010; Reents *et al.*, 2006). Diese Regulatoren koordinieren unterschiedliche Typen von sauerstofflabilen Fe-S Clustern. Der Fnr Regulator aus *B. subtilis* koordiniert ein $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ Cluster, welches für die anaerobe Aktivierung verantwortlich ist (Reents *et al.*, 2006). Der IscR Regulator aus *E. coli* hingegen koordiniert ein $[2\text{Fe-2S}]$ Cluster und ist für die Kontrolle der Fe-S Cluster Biogenese zuständig (Fleischhacker *et al.*, 2012). Der VnfA Regulator aus *A. vinelandii* ist in der Lage ein $[3\text{Fe-4S}]$ Cluster als Kofaktor zu binden, umso direkten Einfluss auf die Expression eines Nitrogenase Systems zu nehmen (Nakajima *et al.*, 2010). Alle drei Regulatoren zeigen mit gebundenem Kofaktor eine charakteristische Absorption in der UV/Vis Spektroskopie zwischen 410 nm und 420 nm. Neben der Reduktion der Schulter bei 410 nm in der UV/Vis Spektroskopie, ist der Verlust des Fe-S Clusters durch Sauerstoff auch in der abnehmenden Braunfärbung des RirA Proteins zu beobachten. Nach ca. 24 h ist nahezu keine Absorption bei 410 nm mehr zu erkennen und die Proteinlösung ist farblos. Zusätzlich nimmt auch der Anteil an löslichem Protein ab. Ohne den gebundenen Kofaktor verliert das RirA Protein seine Löslichkeit und aggregiert.

4.2.4 Biochemische Charakterisierung eines $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Clusters als Kofaktor

Zur Charakterisierung des gebundenen Kofaktors in *D. shibae* RirA wurden Elektronen Spin Resonanz (ESR) spektroskopische Experimente durchgeführt. Hierzu wurden Proteinmengen zwischen 20 μM und 100 μM des anaerob gereinigten Proteins in einem Volumen von 300 μl verwendet und bei verschiedenen Temperaturen vermessen. Bei dieser Technik wird jede Probe auf ihren Einfluss hinsichtlich ihrer inneren magnetischen und elektrostatischen Felder auf das ungepaarte Elektron untersucht. Durch diese Wechselwirkungen, die ausschließlich mit ungepaarten Elektronen ($S = 1/2$) eingegangen werden können, entstehen spezifische Spektren mit charakteristischen Linienzahlen und Linienbreiten (Dormann, 1995).

Im gemessenen ESR Spektrum bei ca. 40 K einer anaerob gereinigten RirA Probe entsteht ein Spektrum mit 4 deutlich zu erkennenden Peaks (Abb. 25 schwarze Kurve, ex.). Durch die Verwendung einer Simulation mit vorgegebenen Parametern, die den Bereich der Peaks abdecken, wird ersichtlich, dass der kleinste Peak bei einem g-Wert nahe an 2 durch

das Hintergrundrauschen verursacht wird und nicht durch das paramagnetische Verhalten des an das RirA Protein gebundenen Kofaktors (Abb. 25 rote Kurve, sim.). Die spezifischen Peaks weisen g-Werte von $g_x = 2.028$, $g_y = 2.020$ und $g_z = 2.005$ auf. Der Bereich dieser g-Werte ist typisch für $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Clustern, die bereits in anderen Proteinen charakterisiert worden sind (Beinert & Thomson, 1983; Pandelia *et al.*, 2011).

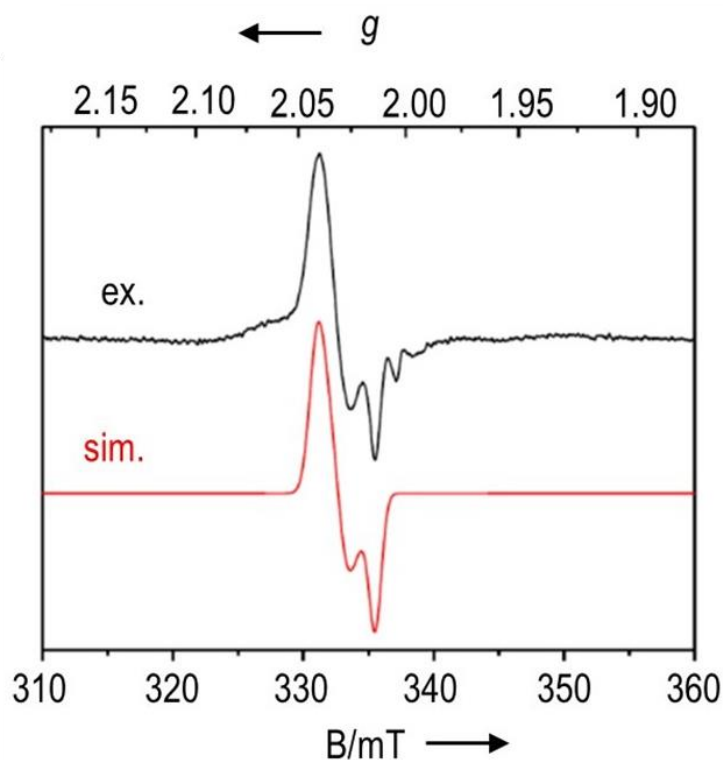


Abb. 25: ESR Spektrum von *D. shibae* StrepII-RirA weist auf ein $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Cluster als Kofaktor hin. Ein ESR Spektrum von 100 μM anaerob gereinigtem StrepII-RirA Protein wurde bei einer Temperatur von 40 K mit einer Mikrowellenfrequenz von 9,457277 GHz und einer Modulationsamplitude von 1,0 mT aufgenommen. Die experimentellen Messdaten (ex.) sind als schwarze Kurve und eine entsprechende Simulation (sim.) als rote Kurve dargestellt. Die ermittelten g-Werte liegen bei $g_x = 2.028$, $g_y = 2.020$ und $g_z = 2.005$ und entsprechen Literaturwerten eines $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Clusters.

Mit einer Messtemperatur von ca. 40 K liegt diese deutlich höher als bei anderen vermessenen Proteinen, die Fe-S Cluster koordinieren. Aus diesem Grund wurde die Messung temperaturabhängig von 4,5 K bis 72 K wiederholt. Die aus den gemessenen Spektren ermittelte Simulation weist ebenfalls die charakteristischen g- Werte von $g_x = 2.028$, $g_y = 2.020$ und $g_z = 2.005$ für ein $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Cluster auf (Abb. 26, orange Kurve). Zusätzlich fällt bei der temperaturabhängigen Messung auf, dass mit zunehmender Temperatur die Signalstärke zunimmt (Abb. 26 A, vgl. 6 K und 36 K) und bei 36 K ihr Maximum an Intensität erreicht (Abb. 26 B). Bei einer Temperatur von 72 K nimmt die Intensität wie-

der ab (Abb. 26 A+B, 72 K). Die g-Werte sowie die Linienbreite bleiben bei jeder gemessenen Temperatur identisch. Die temperaturabhängige Intensität der Spektren lässt sich gut durch die Bleaney-Bowers-Gleichung wiedergeben (Abb. 26, C) und zeigt den Zusammenhang zwischen der Temperatur bei der die Messung durchgeführt wird, und der Intensität der gemessenen Spektren.

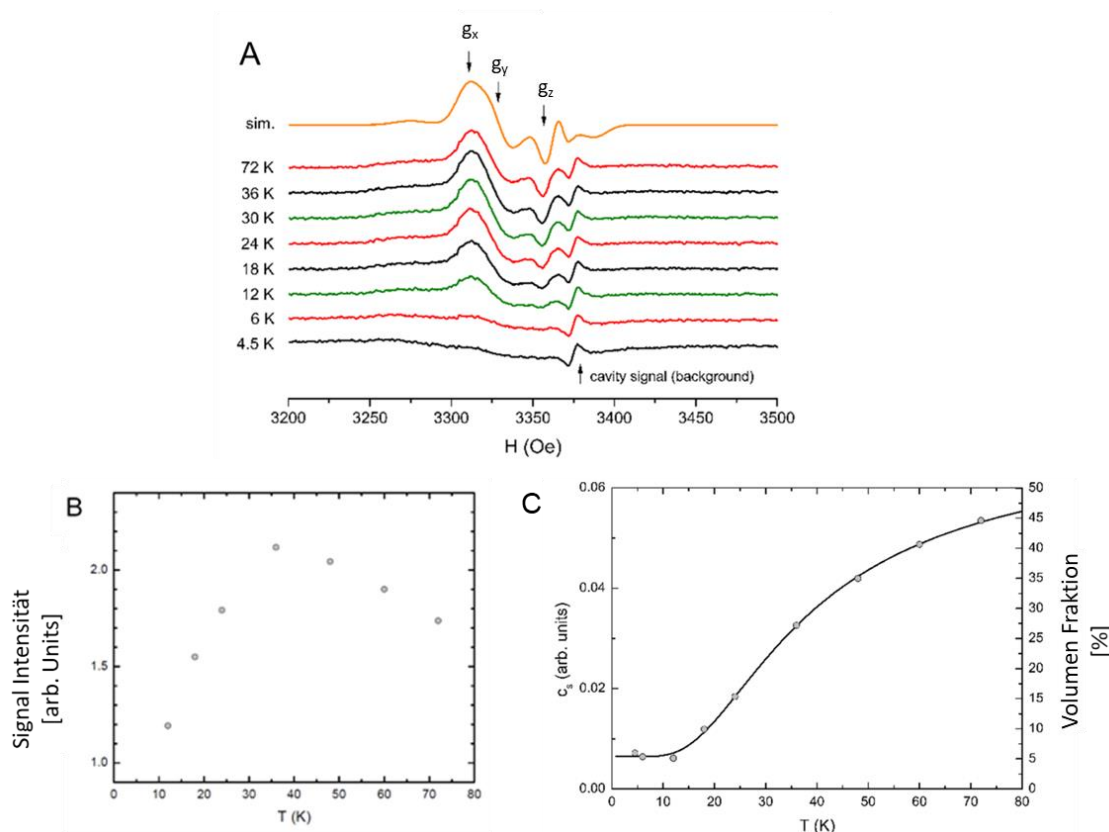


Abb. 26: Temperaturabhängige ESR Spektren von *D. shibae* StrepII-RirA weisen auf ein $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Cluster als Kofaktor hin. A: ESR Spektren von 20 μM anaerob gereinigtem StrepII RirA Protein wurden in einem Temperaturbereich von 4.5 bis 72 K aufgenommen (A; schwarze, grüne, rote Kurven). Die orange Kurve zeigt die ermittelte Simulation auf Basis der gemessenen Daten und gibt die g-Werte 2.043, 2.030 und 2.015 aus. Für die ESR Spektren wurde eine Modulationsamplitude von 8 Oe und eine Mikrowellen Stärke von 3.2 mW verwendet. B: Signalintensität der gemessenen ESR Spektren in Abhängigkeit zu der Messtemperatur. Aufgetragen wurden die Intensitäten aus A bei Temperaturen zwischen 12 K und 72 K. C: Temperaturabhängigkeit der ermittelten Spin Konzentrationen und Volumen Fraktionen. Der Graph zeigt den Verlauf einer typischen Bleaney-Bowers Gleichung für zwei antiferromagnetisch gekoppelte $S=1/2$ Spins.

Da es sich bei den $[3\text{Fe-4S}]$ Clustern um Abbauprodukte von $[4\text{Fe-4S}]$ Clustern handeln kann, die weiter zu $[2\text{Fe-2S}]$ Clustern zerfallen, könnte es sein, dass es sich bei dem gemessenen $[3\text{Fe-4S}]$ Cluster um ein Zerfallsprodukt eines $[4\text{Fe-4S}]$ Clusters handelt. Für das RirA Protein aus *R. leguminosarum* konnte bereits gezeigt werden, dass das gefundene $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Cluster ein transients Übergangszustand eines degradierten $[4\text{Fe-4S}]$

Clusters ist. Das gefundene [4Fe-4S] Cluster in *R. leguminosarum* ist ziemlich instabil und konnte erst nach der Rekonstitution gefunden werden (Pellicer Martinez *et al.*, 2017).

Um auszuschließen, dass bereits während der heterologen Produktion des *D. shibae* RirA in *E. coli* der Aufbau und Einbau des Clusters Limitierungen unterliegt, wurden zusätzliche Plasmide in den Produktionsstamm transformiert. In *D. shibae* wurde ein Gencluster identifiziert, das für Proteine codiert, die eine starke Homologie zum SUF System der Fe-S Cluster Biogenese besitzt. *E. coli* besitzt zwei Fe-S Cluster Biosynthesesysteme, das ISC und das SUF System, wobei der Aufbau von Fe-S Cluster in *E. coli* abhängig ist vom ISC System (Outten *et al.*, 2004; Jang & Imlay, 2010). Unter Stressbedingungen wird in *E. coli* das SUF System zum Aufbau der Cluster verwendet. Um Limitationen während der Produktion von RirA vorzubeugen wurde entweder das Plasmid pRKSUF017 (Takahashi & Tokumoto, 2002) oder das Plasmid pRKISC (Takahashi & Nakamura, 1999) in den Produktionsstamm transformiert, um eine Überproduktion des SUF- oder ISC Systems zu gewährleisten. So entstanden die Produktionsstämme BL21CD+(DE3)-RIL pET52***brirA*** pRKSUF017 und BL21CD+(DE3)-RIL pET52***brirA*** pRKISC.

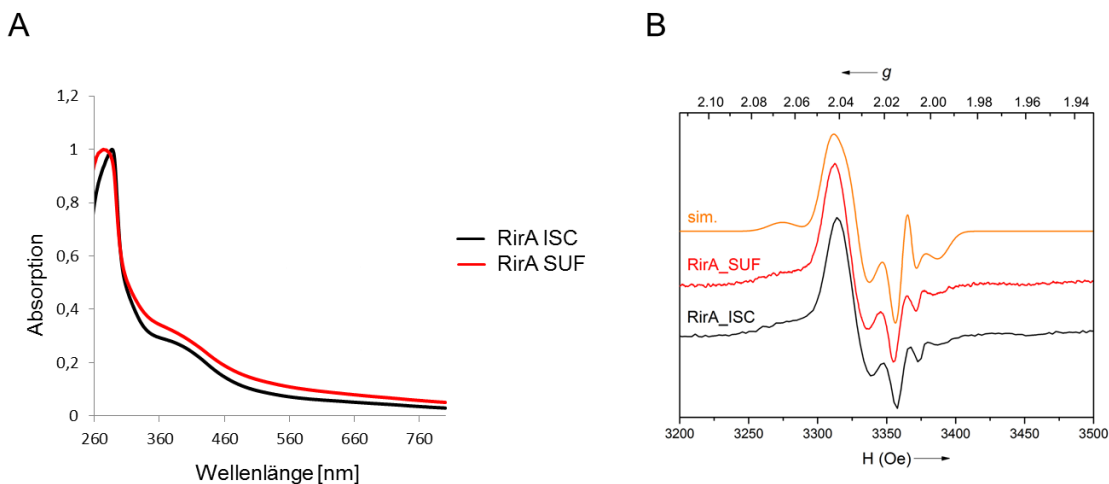


Abb. 27: UV/Vis und ESR Spektren des gereinigten StrepII-RirA aus *E. coli* Produktionszellen mit zusätzlichem ISC oder SUF System. UV/Vis Spektren (A) und ESR Spektren (B) von 100 μ M gereinigtem StrepII RirA Protein aus den Produktionsstämmen BL21CD+(DE3)-RILpET52***brirA*** pRKSUF017 (rote Kurve) oder BL21CD+(DE3)-RILpET52***brirA*** pRKISC (schwarze Kurve). Die orange Kurve zeigt die ermittelte Simulation auf Basis der gemessenen Daten der ESR Spektren an. Für die ESR Spektren wurde eine Modulationsamplitude von 10 Oe und eine Mikrowellen Stärke von 9.4574 GHz verwendet. Die ESR Spektren wurden bei einer Temperatur von 40 K gemessen.

Aus den neuen Produktionsstämmen wurde jeweils das StrepII-RirA Fusionsprotein anaerob gereinigt, und durch UV/Vis und ESR Spektroskopie vermessen (Abb. 27). Beide anaerob gereinigten Proteine zeigen im UV/ Vis die charakteristische Absorption bei

410 nm (Abb. 27 A). Die ESR Spektren wurden bei 40 K vermessen, entsprechend der stärksten Intensität für das StrepII-RirA Protein. Das StrepII-RirA Fusionsprotein aus dem SUF überproduzierenden Stamm (Abb. 27, roter Graph) zeigt ein identisches Signal wie das StrepII-RirA Fusionsprotein aus dem ISC überproduzierenden Stamm (Abb. 27, schwarzer Graph). Die Simulation der Spektren (Abb. 27 B, orangener Graph) zeigt die identischen g-Werte von 2.028, 2.020 und 2.005 wie bei dem StrepII-RirA Fusionsprotein ohne ISC und SUF Systeme. Somit hat die Verwendung von einem der beiden Biogenese Systeme von Fe-S Clustern keinen Einfluss auf den Einbau des Fe-S Clusters in das RirA Protein. Um dennoch zu jeder Zeit einen optimalen Einbau des Clusters zu gewährleisten, wurde für die weiteren Experimente der Produktionsstamm BL21CD+(DE3)-RIL pET52*brirA* pRKSUF017 verwendet.

Um heraus zu finden, ob es sich bei den gefundenen $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Cluster um ein unvollständiges $[4\text{Fe-4S}]$ Cluster handelt, wurden Rekonstitutionsexperimente durchgeführt.

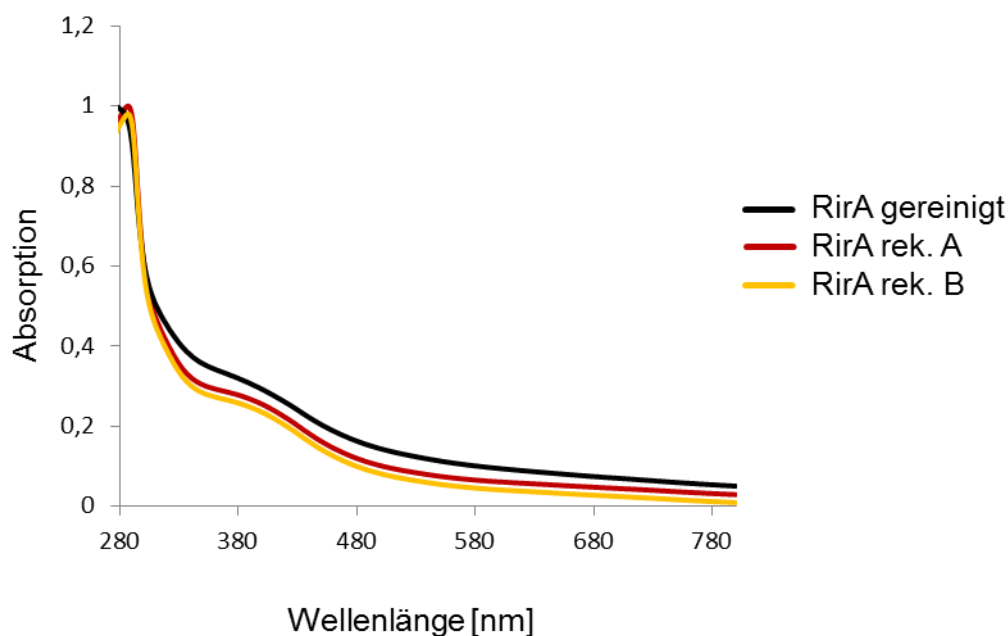


Abb. 28: UV/Vis Spektren zweier ausgewählter Rekonstitutionsexperimente. 100 μM des anaerob gereinigten StrepII-RirA Proteins wurde im UV/Vis vermessen und anschließend rekonstituiert. In der Probe A (roter Graph) wurden zu 100 μM RirA Protein 10 μM Fe-Ammoniumcitrat und 500 μM Lithiumsulfid für die Rekonstitution hinzu gegeben. Für die Probe B (gelber Graph) wurden zu 200 μM RirA Protein mit 10 μM Fe-Ammoniumcitrat und 500 μM Lithiumsulfid inkubiert.

Durch die Zugabe von verschiedenen Mengen an Fe-Ammoniumcitrat und Lithiumsulfid könnte ein fehlendes Eisen in das Fe-S Clusters eingebaut werden. Dabei wurde die

Fe-Citrat Menge sowie die Menge an Lithiumsulfid von 10 μM bis 500 μM variiert (Tabelle 26, Anhang). Bereits nach kurzer Zeit ist während der Rekonstitution ein großer Anteil des Proteins durch die irreversible Bildung und Bindung von Eisensulfid ausgefallen. Der verbliebene lösliche Anteil an StrepII-RirA Protein wurde konzentriert und erneut im UV/Vis vermessen. Zusätzlich wurde auch die eingesetzte RirA Konzentration von 100 bis 200 μM variiert. Die UV/Vis Spektren zeigen immer noch eine deutliche Absorption bei 410 nm (Abb. 28). Es sind keine deutlichen Veränderungen nach der Rekonstitution im Vergleich zum gereinigten RirA Protein zu erkennen.

Dies ist ein weiterer Hinweis auf ein stabiles $[\text{3Fe-4S}]$ Cluster als gebundener Kofaktor für den RirA Regulator aus *D. shibae*.

Darüber hinaus würde ein $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ Cluster, das an RirA gebunden vorliegt, nach der Reduktion im ESR Spektrum sichtbar werden. Durch eine chemische und eine elektrochemische Reduktion sollte untersucht werden, ob das RirA Protein weitere Reduktionsschritte durchlaufen kann und eventuell an einem Elektronentransport beteiligt sein könnte. Hierzu wurde das anaerob gereinigte Protein mit 12,5 mM Na-Dithionit oder 50 μM 5-Deazaflavin und Licht chemisch reduziert.

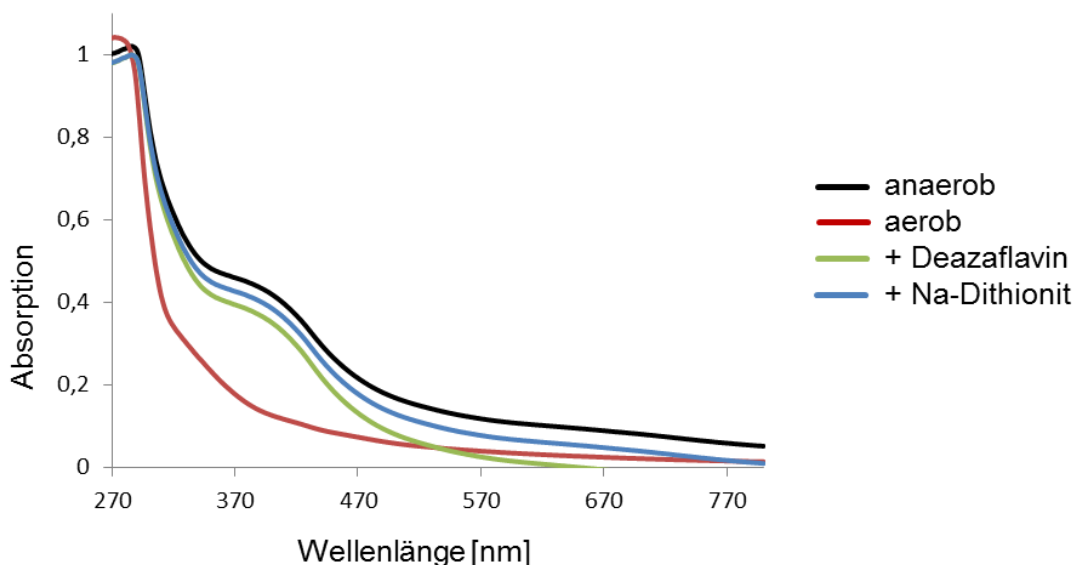


Abb. 29: UV/Vis Spektren des StrepII-RirA Proteins nach der chemischen Reduktion. Das anaerob gereinigte Protein wurde im UV/Vis vermessen (schwarze Kurve) und anschließend entweder an Luftsauerstoff oxidiert bis zum kompletten Zerfall des Clusters (rote Kurve) oder durch die Zugabe von 12,5 mM Natrium Dithionit (blaue Kurve) oder 50 μM 5-Deazaflavin und Licht chemisch reduziert (grüne Kurve).

Das StrepII-RirA Protein wurde anaerob gereinigt und spektroskopisch im UV/Vis Bereich vermessen (Abb. 29, schwarze Kurve). Anschließend wurde das Protein an Luftsauerstoff oxidiert, was zu einem kompletten Verlust des [3Fe-4S] Clusters führt (Abb. 29, rote Kurve). Bei der Reduktion des anaerob gereinigten StrepII-RirA mit Na-Dithionit zeigte sich eine leicht verringerte Absorption bei 410 nm im UV/ Vis Spektrum im Vergleich zum nicht reduzierten Protein (Abb. 29, blaue Kurve). Bei der Verwendung von Deazaflavin und Licht ist ein geringer Anteil des Proteins ausgefallen. Nach der Zentrifugation der Probe wurde eine UV/ Vis Messung durchgeführt und eine Abnahme in der Absorption bei 410 nm im Vergleich mit der nicht reduzierten Probe detektiert (Abb. 29, grüne Kurve). Teile des Clusters scheinen durch das Deazaflavin zerstört worden zu sein. Ohne den intakten Kofaktor ist das RirA Protein nicht länger stabil und fällt aus.

Da die UV/Vis Spektren der reduzierten Proteine nur eine leichte Reduktion bei 410 nm zeigten und daraus keine direkten Schlüsse auf das Redoxverhalten des RirA Proteins geschlossen werden konnten, wurde die StrepII-RirA Probe mit Na-Dithionit reduziert und im ESR vermessen. Die anaerob gereinigte Protein Probe (Abb. 30 A, schwarze Kurve) zeigte die erwarteten g-Werte 2.028, 2.020 und 2.005 die auch in der Simulation (Abb. 30 A, orange Kurve) zu finden waren. Die reduzierte Proteinprobe (Abb. 30 A, rote Kurve) entspricht der nicht reduzierten Probe und weist darauf hin, dass das [3Fe-4S] Cluster stabil ist und kein Zwischenprodukt bzw. Abbauprodukt eines [4Fe-4S] Clusters war. Denn dann hätte eine weitere Reduktion bis zu einem [2Fe-2S] Clusters möglich sein müssen. Es gibt aber auch kein neues Signal, dass nach Reduktion eines im ESR nicht sichtbaren [4Fe-4S]²⁺ Clusters entstanden wäre.

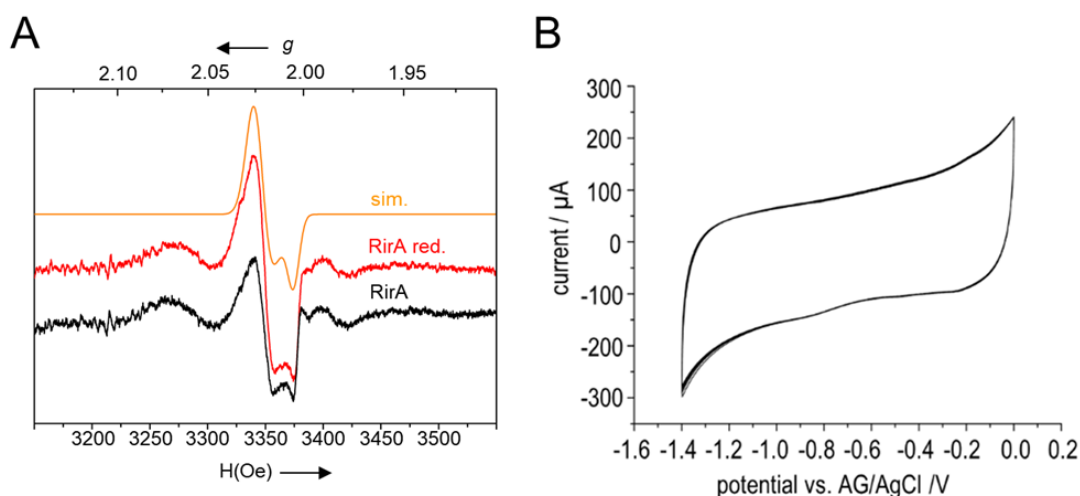


Abb. 30: ESR und CV Spektren des StrepII-RirA Proteins zur Ermittlung des Reduktionspotentials.
A: Das anaerob gereinigte StrepII-RirA Protein (100 μ M) wurde im ESR vermessen (schwarze Kurve) und

mit 12,5 mM Na-Dithionit reduziert (rote Kurve). Die Simulation (orange Kurve) zeigt die g-Werte 2.028, 2.020 und 2.005. Es wurde eine Mikrowellen Frequenz von 9.4700 GHz verwendet mit einer Modulationsamplitude von 10 Oe und einer Mikrowellenstärke von 20,12 mW. B: Cyclisches Voltammogramm des anaerob gereinigten StrepII-RirA Proteins. 120 μ M des Proteins wurden unter einer Stickstoff Atmosphäre mit einer Silber/Silberchlorid Elektrode als Referenz, einer Glaskohlenstoffelektrode als Arbeitselektrode und einem Platinum Draht als Gegenelektrode vermessen.

Als letzter Test für das Redoxverhalten des RirA Regulators wurde eine elektrochemische Reduktion mittels cyclischer Voltammetrie durchgeführt (Abb. 30 B). Hierbei wird ein elektrochemisches Potential angelegt unter Verwendung einer Silber/Silberchlorid Elektrode als Referenz, einer Glaskohlenstoffelektrode als Arbeitselektrode und einem Platinum Draht als Gegenelektrode und beobachtet, ob sich das Protein bzw. der gebundene Kofaktor unter einer Stickstoffatmosphäre oxidieren oder reduzieren lässt. Das Ergebnis der Cyclischen Voltammetrie unterstützt das Ergebnis der chemischen Reduktion. Denn auch hier konnte weder eine Oxidation noch eine Reduktion beobachtet werden. Somit handelt es sich bei dem Kofaktor des RirA Regulators aus *D. shibae* um ein stabiles $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Cluster ohne Redoxaktivität und nicht wie anfangs vermutet um ein eventuelles Abbauprodukt eines $[4\text{Fe-4S}]$ Clusters.

Tabelle 16: Mössbauer Parameter gemessen bei 20 K für die nicht produzierenden (A) und die produzierenden (B) *E. coli* Zellen. Die Spektren wurden nach dem Modell der kleinsten Quadrate und den Dupletts der Lorenzfunktion analysiert. Die Daten beziehen sich auf die Experimente in Abb. 31.

Komponente		δ^a (mm s ⁻¹)	ΔE_Q (mm s ⁻¹)	Γ_{HWHM} (mm s ⁻¹)	Relative Kontribution (%)
A. Kontrolle					
1	ferrous high-spin, Fe ²⁺	1.32(2)	3.06(3)	0.18(3)	29
2	ferrous high-spin, Fe ²⁺	1.04(4)	2.92(4)	0.25(4)	28
3	ferric high-spin, Fe ³⁺	0.50(1)	0.93(3)	0.26(2)	43
B. RirA					
1	ferrous high-spin, Fe ²⁺	1.38(4)	3.02(5)	0.24(5)	28
2	ferrous high-spin, Fe ²⁺	1.04(7)	2.90(7)	0.23(8)	14
3	ferric high-spin, Fe ³⁺	0.51(3)	0.87(3)	0.27(3)	41
4	$[3\text{Fe-4S}]^{1+}_{\text{cube}}$	0.27(3)	0.66(7)	0.22(6)	19

^a Die Isomer-Verschiebung werden in Relation zu den α -Eisen bei Raumtemperatur angegeben und nicht nach den Bedingungen des Dopplereffekts zweiter Ordnung korrigiert.

Um den Typ des [3Fe-4S] Clusters näher zu charakterisieren, wurden *in vivo* Mössbauer Experimente durchgeführt. Die *in vivo* Methode wurde gewählt, um den Verlust von Fe-S Clustern während der Aufreinigung des RirA Proteins zu verhindern. Die *in vivo* Mössbauer Analyse wurde bereits erfolgreich bei der Charakterisierung des [4Fe-4S]²⁺ Clusters des anaeroben Regulators Fnr aus *B. subtilis* angewendet (Gruner *et al.*, 2011).

Für die *in vivo* Mössbauer Analysen des RirA Proteins aus *D. shibae* wurden zwei Produktionsstämme verwendet. Zum einen der Kontrollstamm (Abb. 31 A) BL21CD+(DE3)-RIL pET52b pRKSUF017 der nicht in der Lage ist das StrepII-RirA Fusionsprotein zu überproduzieren und zum anderen der Produktionsstamm BL21CD+(DE3)-RIL pET52b*rirA* pRKSUF017, welcher das RirA Protein produziert (Abb. 31 B). Zum Zeitpunkt der Induktion mit 100 μ M IPTG wurden zusätzlich 34 μ M ⁵⁷Fe-Citrat dazu gegeben. Die Zellen wurden nach 20 h anaerob geerntet, das Pellet gewaschen und in ein Mössbauertöpfchen überführt. In der Kontrollprobe ohne überproduziertes RirA Protein konnten drei Signale für unterschiedliche Eisen Komponenten gefunden werden (Tabelle 16). Es konnten Signale für Fe³⁺ Cluster Subspektrum 1 (Abb. 31, grüne Kurve), für freies Eisen Subspektrum 2 (Abb. 31, rote Kurve) und Signale für Fe²⁺ Cluster Subspektrum 3 (Abb. 31, schwarze Kurve) in der Kontrollprobe detektiert werden. Im Unterschied zum Zellpellet ohne RirA Produktion, findet sich in der Probe mit RirA ein weiteres Signal, welches das Subspektrum 4 bildet (Abb. 31 B, blaue Kurve). Eine Betrachtung der gemessenen Parameter aus Tabelle 16 zeigt, dass das neu entstandene Signal auf Kosten des verfügbaren und gemessenen freien Eisens aus der Kontrollprobe entstanden ist. Das neue Signal weist Werte für den Isomer Shift von $\delta = 0.27(3) \text{ mm s}^{-1}$ und der Quadrupole Aufspaltung von $\Delta E_Q = 0.66(7) \text{ mm s}^{-1}$ mit einem Eisenanteil in der Probe von 19% auf (Tabelle 16). Um die Werte zu verifizieren wurde eine Spin Quantifizierung mit CuEDTA durchgeführt.

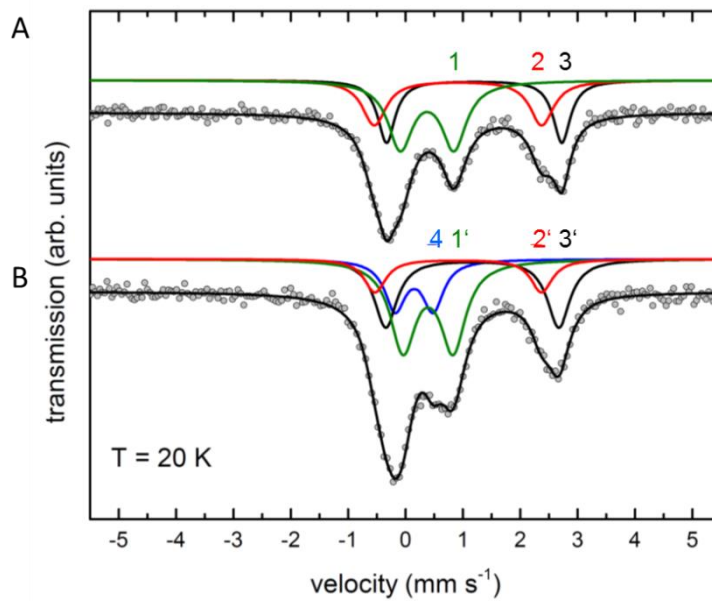


Abb. 31: *In vivo* Mössbauer Spektren des gereinigten StrepII-RirA Proteins. Die Mössbauer Spektren für den *E. coli* Produktionsstamm BL21CD+(DE3)-RIL pET52b pRKSUF017 der als Kontrolle diente (A) sowie für der RirA überproduzierenden Stamm BL21CD+(DE3)-RIL pET52brirA pRKSUF017 (B) wurden bei einer Temperatur von 20 K vermessen. Die Kurven resultieren in dem Modell der kleinsten Quadrate mit Dupletts der Lorenzfunktion für freies Eisen (rote Kurve) für Fe^{2+} Cluster (schwarze Kurve) und Fe^{3+} Cluster (grüne Kurve).

Diese Ergebnisse der Mössbauer Analyse unterstützen die Annahme dass es sich um ein $[\text{3Fe-4S}]$ Cluster als Kofaktor handelt. Zusätzlich indizieren die Werte eine rhombische Form des Clusters im $1+$ Zustand.

4.2.5 Zweiwertige Ionen können nicht als vierter Ligand im $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$ Cluster dienen

Der Kofaktor von RirA ist ein stabiles $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$ Cluster mit einer möglichen freien vierten Position im Kubus (Abb. 32). Es ist bekannt, dass einige Cluster diese freie Position durch andere Ionen besetzen können, um so den vorhandenen Gehalt an den eingebauten Ionen zu ermitteln. Bei einer Bindung in den Kubus, könnten die zweiwertigen Ionen somit als potentielle Signalmoleküle wirken. Um mögliche Liganden für die freie Position zu finden wurden dem anaerob gereinigten RirA Protein zweiwertige Ionen in einem 1,5 fachen Überschuss zugegeben und die Proteinlösungen anschließend im ESR vermessen. Als potentielle Liganden wurde Fe(II) in Form von Eisenchlorid (Abb. 33, rote Kurve), Cd(II) in Form von Cadmiumchlorid (Abb. 33, schwarze Kurve) und Ni(II) in Form von Nickelchlorid (Abb. 33, grüne Kurve) angeboten. Bei einer Bindung in den Kubus, könnten die zweiwertigen Ionen als potentielle Signalmoleküle wirken.

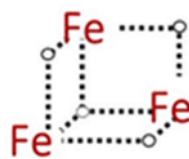


Abb. 32: Rhombische Form des $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Clusters von RirA. Die vierte freie Ligandenposition ist durch einen roten Punkt markiert.

Alle drei gemessenen ESR Spektren zeigen einen identischen Verlauf mit g -Werten von 2.028, 2.020 und 2.005 die in der Simulation den ESR Daten des RirA Wildtyp Proteins mit einem $[3\text{Fe-4S}]$ Cluster entsprechen (Abb. 33, orange Kurve). Somit war es nicht möglich die freie Position mit anderen zweiwertigen Ionen zu besetzen. Das $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Cluster des RirA Regulators aus *D. shibae* ist ohne die Bindung eines weiteren Liganden stabil.

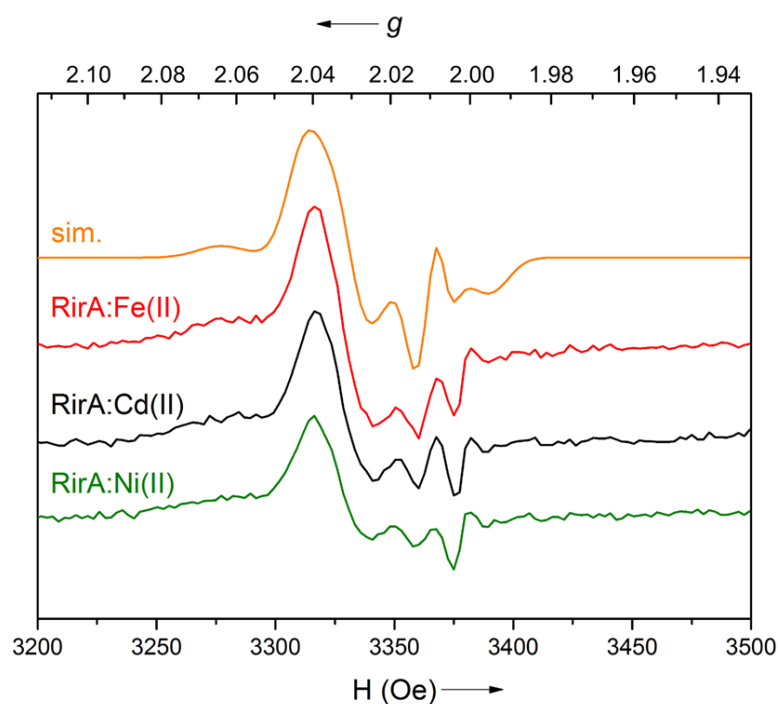


Abb. 33: ESR Spektren des StrepII-RirA Proteins nach Zugabe zweiwertiger Ionen. Die zweiwertigen Ionen wurden in einem 1,5-fachen Überschuss zu 100 μM anaerob gereinigtem RirA Protein gegeben. Als zweiwertige Ionen wurden Chloride von Nickel (grüne Kurve), Cadmium (schwarze Kurve) und Eisen (rote Kurve) verwendet. Die Simulation für ein $[3\text{Fe-4S}]$ Cluster ist als orange Kurve aufgetragen. Es wurde eine Mikrowellenstärke von 12,60 mW, eine Mikrowellenfrequenz von 9,46 GHz und eine Modulationsamplitude von 10 Oe verwendet. Die Spektren wurden zwischen 33 und 39 K aufgenommen.

4.2.6 Quantitative Bestimmung des Eisen und Schwefelgehalts

Die Atom Absorptions Spektroskopie (AAS) wurde als Methode zur Quantifizierung des Eisengehalts in der RirA Proteinlösung eingesetzt (Abb. 34). Hierbei kann der Gehalt an gemessenem Eisen auf die Menge an eingesetztem Protein zurückgeführt werden. Für eine 50 μM Lösung des anaerob gereinigten StrepII-RirA Proteins ergab sich ein Gehalt an Eisen von 148.5 μM ($\pm 8,1 \mu\text{M}$). Dies entspricht einem Verhältnis von 3 Mol Eisen pro Mol RirA.

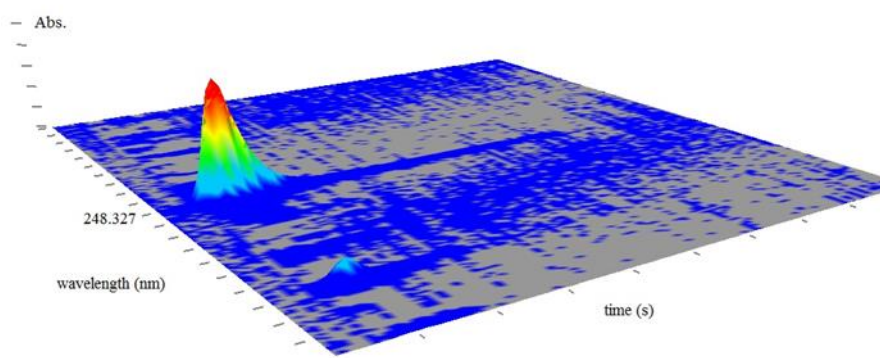


Abb. 34: AAS Spektrum des anaerob gereinigten StrepII-RirA Proteins zur Bestimmung des Eisengehalts. 50 μM anaerob gereinigtes StrepII-RirA Protein wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen auf die Absorption bei der spezifischen Wellenlänge 248,327 untersucht. Als Referenz wurde ein Eisenstandard (Sigma Aldrich, München, Deutschland) für AAS Messungen verwendet.

Parallel zur Bestimmung des Eisengehalts wurde auch der Anteil an Schwefel in der Protein Probe bestimmt. Hierzu wurde sowohl anaerob als auch aerob gereinigtes StrepII-RirA Protein untersucht. Die Messungen wurden jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt und es wurden 50 μM und 100 μM Lösungen vermessen. Je nach enthaltener Schwefelmenge in der Probe kommt es zu unterschiedlich starken Blaufärbungen die spektroskopisch analysiert werden können. Anhand dieser Blaufärbung kann spektroskopisch die Menge an Schwefel in der eingesetzten Proteinprobe bestimmt werden.

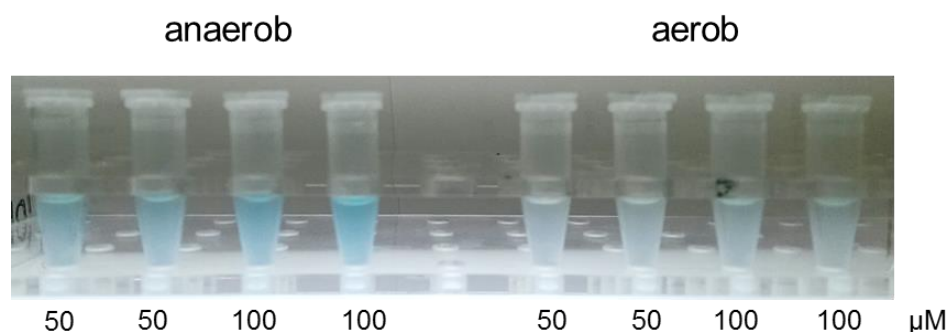


Abb. 35: Bestimmung des Schwefelgehalts in der StrepII-RirA Probe. Es wurden 50 μM und 100 μM anaerob und aerob gereinigtes StrepII-RirA Protein auf den Gehalt an Schwefel hin untersucht. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der Menge an Schwefel in der Probe.

Die anaerob gereinigten StrepII-RirA Proben zeigten eine deutlichere Blaufärbung und somit einen höheren Anteil an Sulfid als die aerob gereinigten Proben (Abb. 35). Hierbei ergab sich für das anaerob gereinigte Protein eine Menge von ca. 245 μM Sulfid pro 50 μM Protein und ca. 390 μM Sulfid pro 100 μM Protein. Dies entspricht einem Verhältnis von 3,9 Mol Schwefel pro Mol RirA Protein. Somit wären in einer 1 μM anaeroben RirA Proteinlösung ein Schwefelgehalt von 3,9 μM enthalten. Für die aerobe 50 μM StrepII-RirA Proteinlösung wurde ein Schwefelgehalt von ca. 15 μM ermittelt und für die 100 μM Lösung von ca. 30 μM . Dies entspricht einem Verhältnis von 0,3 Mol Schwefel pro Mol RirA Protein. Der Gehalt an Schwefel in der aeroben Probe war somit deutlich geringer als in der anaeroben Probe, was für den Verlust an Fe-S Clustern unter aeroben Bedingungen spricht. Das stimmt mit den Ergebnissen aus der UV/Vis Analyse überein, bei der sich nach aerober Exposition die Absorption bei 410 nm drastisch verringert. Eine Betrachtung der Daten aus der UV/Vis und ESR Spektroskopie sowie der Eisen und Schwefelbestimmung zusammen mit dem Ergebnis der *in vivo* Mössbauer Analyse zeigt, dass der RirA Regulator aus *D. shibae* ein Sauerstoff labiles $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$ Clusters als Kofaktor koordiniert.

4.2.7 Das $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$ Cluster wird durch drei Cystein Liganden koordiniert

RirA gehört der Familie der Rrf2 Transkriptionsfaktoren an (Hantke, 2001). Einige Mitglieder dieser Familie sind ebenfalls in der Lage ein Fe-S Cluster als Kofaktor zu koordinieren. Hierzu werden hoch konservierte Cysteine, Histidine und Aspartate verwendet. Ein Sequenzvergleich von RirA Proteinen verschiedener Alphaproteobakterien zeigt, dass innerhalb der Alphaproteobakterien die Sequenz Homologien zwischen 40 % und 45 % liegen. Im Vergleich zum RirA aus *D. shibae* (gi_159044209) weist *Agrobacterium tumefaciens* (gi_586948310) eine Identität von 40 % auf, *Rhizobium leguminosarum*

(gi_115255197) eine Identität von 42.67 %, *Sinorhizobium meliloti* (gi_589247167) eine Identität von 44 %, *Brucella suis* (gi_597800135) eine Identität von 44.67 % und *Bartonella henselae* (gi_603661611) eine Identität von 40.94 %. In der Proteinsequenz des *D. shibae* RirA sind verschiedene Strukturelemente wie α -Helices (Abb. 36, grün) und β -Faltblätter (Abb. 36, blau) zu finden, die anhand einer Modellierung mit dem kristallisierten IscR Protein (PDB 4hf1) identifiziert wurden.

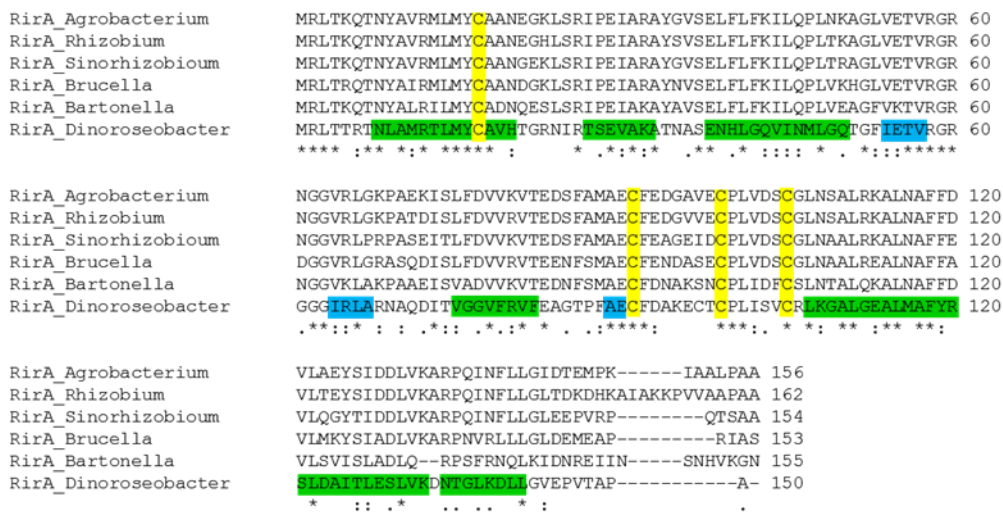


Abb. 36: Sequenzalignment verschiedener RirA Proteine innerhalb der Alphaproteobakterien. Identische Aminosäurereste wurden mit Sternchen markiert und homologe Aminosäurereste mit Punkten. Vorhergesagte Sekundärstrukturelemente des RirA Proteins aus *D. shibae* sind farblich markiert (α -helices grün und β -Faltblätter blau). Hoch konservierte Cystein Reste sind gelb markiert. Das Alignment wurde mit ClustalW2 (EMBL-EBI) generiert. Die Vorhersage der Sekundärstrukturelemente wurde mit Predict-Protein (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/>) anhand des bereits kristallisierten IscR Proteins (PDB 5hf1) durchgeführt.

Beim Aminosäuresequenzvergleich fällt auf, dass es vier hoch konservierte Cysteine in der Protein Sequenz von RirA gibt (Abb. 36, gelb). Diese konservierten Cysteine liegen beim *D. shibae* RirA an den Positionen 17, 91, 99 und 105 (Abb. 36, gelb). Zusätzlich befindet sich in der Sequenz von RirA aus *D. shibae* noch ein weiteres Cystein an Position 97.

Durch eine ortsgerichtete Mutagenese wurden die hoch konservierten einzelnen Cysteine gegen Alanine ausgetauscht. Alanine besitzen apolare, hydrophobe Seitenketten und durch die geringe Größe der Aminosäure werden sterische Hinderungen vermieden. Zusätzlich wurde eine (5CMut) Mutante generiert, in der alle fünf Cysteine gegen Alanine ausgetauscht worden sind. So entstanden die Plasmide pET52*brirAC17A*, pET52*brirAC91A*, pET52*brirAC99A*, pET52*brirAC105A* und pET52*brirA5CMut*, die

anschließend in dem *E. coli* Stamm BL21CD+(DE3)-RIL pRKSUF017 produziert, anaerob gereinigt und im UV/Vis vermessen worden sind.

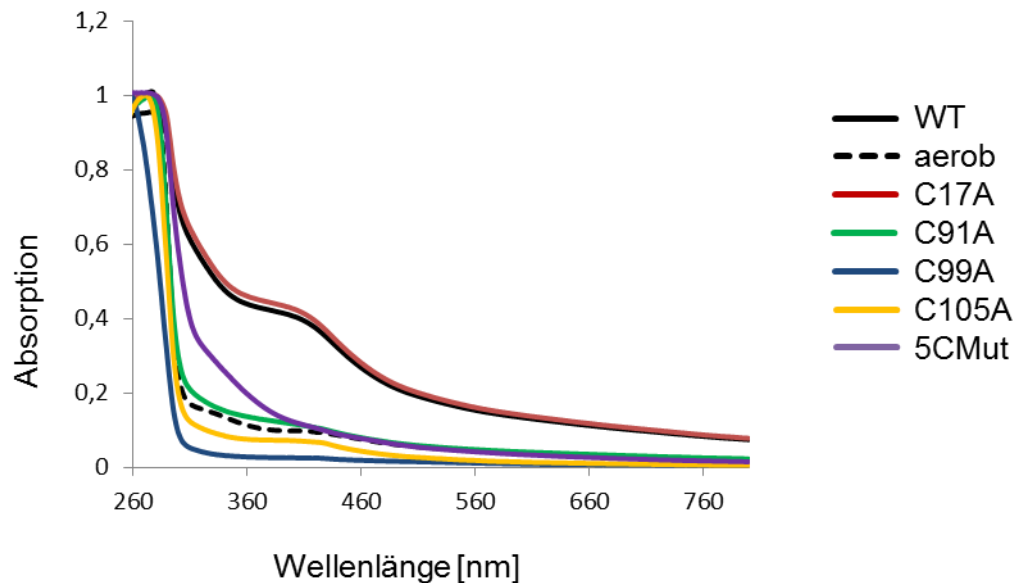


Abb. 37: UV/Vis Spektren des RirA Proteins nach Austausch der Cysteine durch Alanine via ortsgerichteter Mutagenese. UV/Vis Spektren des anaerob gereinigten StrepII-RirA Wildtyp Proteins (schwarze Kurve), des aerob gereinigten Proteins (gestrichelte Kurve) und der Cys Mutanten C17A (rote Kurve), C91A (grüne Kurve), C99A (blaue Kurve), C105A (gelbe Kurve) und 5CMut (lila Kurve).

Die C17A Mutante (Abb. 37, rote Kurve) zeigte ein identisches Spektrum wie das RirA WT Protein (Abb. 37, schwarze Kurve) mit der typischen Absorption bei 410 nm. Im Gegensatz dazu zeigen die C91A (Abb. 37, grüne Kurve), C99A (Abb. 37, blaue Kurve), C105A (Abb. 37, gelbe Kurve) und die 5CMut (Abb. 37, lila Kurve) Mutante keine Absorption bei 410 nm mehr und ähneln im Verlauf der aeroben RirA Probe (Abb. 37, gestrichelte Kurve), die kein Fe-S Cluster mehr enthält. Dies führt zu der Annahme, dass das $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Cluster von *D. shibae* RirA durch die drei Cysteine an den Positionen Cys91, Cys99 und Cys105 koordiniert wird. Kommt es zum Verlust eines dieser Cysteine durch Mutagenese, kann das Fe-S Cluster gar nicht mehr oder nicht mehr vollständig koordiniert werden und es kommt zu einer reduzierten Absorption bei 410 nm im UV/Vis Spektrum. Eine anschließende Bestimmung des Schwefelgehalts in den Mutanten unterstützt dieses Ergebnis. Der Wildtyp wies einen Schwefelgehalt von 3,9 μmol Schwefel pro μmol Protein auf. Dieser Wert passt zu den gemessenen 4,0 μmol Schwefel pro μmol Protein in der C17A Mutante. Die Cystein Mutante C91A weist einen Schwefelgehalt von 2 μmol auf, die C99A Mutante von 1,4 μmol , die C105A Mutante von 0,8 μmol und die 5CMut Mutante von 0,6 μmol Schwefel pro μmol Protein.

4.2.8 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von RirA

Transkriptionsfaktoren der Rrf2 Familie bilden oft Dimere und binden als Dimer an palindromische Sequenzen an der DNA wie der Regulator CymR (Shepard *et al.*, 2011). Um den Oligomerisierungsgrad des anaeroben und aeroben RirA Wildtypproteins sowie der Mutanten C17A, C91A, C99A, C105A *in vitro* bestimmen zu können, wurden diese heterolog in *E. coli* produziert und anaerob gereinigt. Für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades wurde eine analytische Gelpermeationschromatographie (GPC) durchgeführt. Hierbei wird die relative molekulare Masse nativer Proteine bestimmt. Für die analytische Gelpermeationschromatographie wurde eine Superdex™75 10/300 GL verwendet die Proteine von 3 bis 70 kDa auftrennen kann. Kleinere Moleküle verbleiben länger auf der Säule, da sie in die Matrix des Säulenbettes einwandern können wohingegen größere Moleküle schneller das Säulenmaterial passieren.

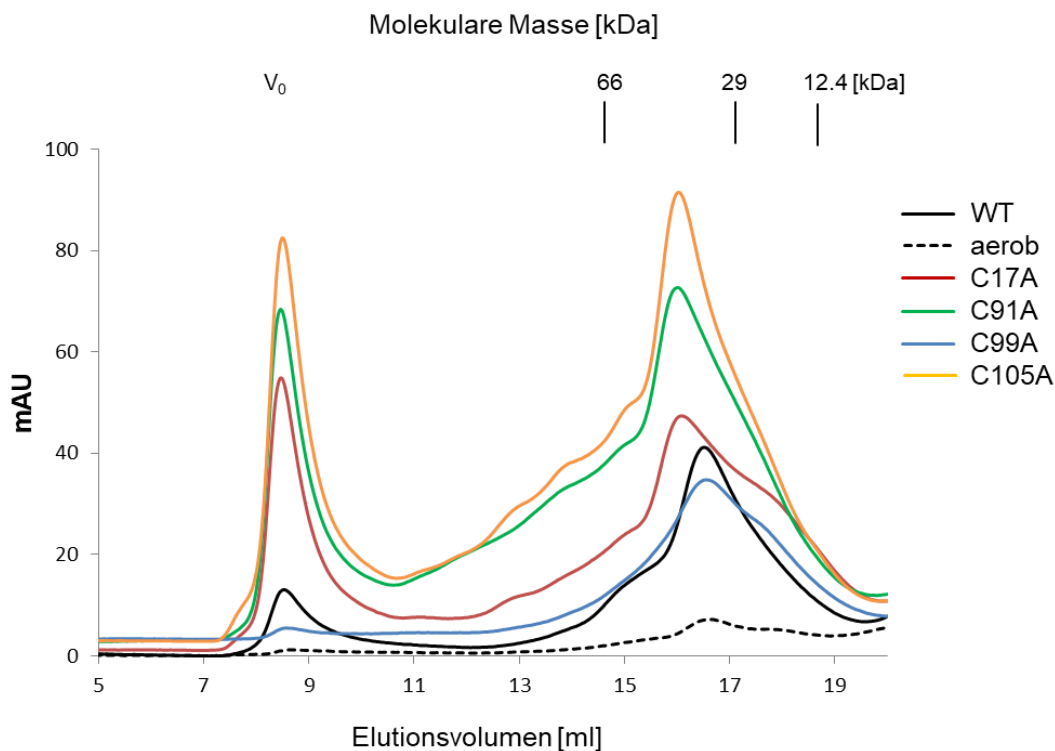


Abb. 38: Analytische Gelpermeationschromatographie von StrepII-RirA und den Cystein Mutanten. Für die analytische GPC wurden jeweils 200 μ M Protein und eine Superdex™ 75(10/300) GL Säule verwendet. Das anaerobe StrepII-RirA Wildtyp Protein (schwarze Kurve), das aerobe Protein (gestrichelte Kurve), sowie die Mutanten C17A (rote Kurve), C91A (grüne Kurve), C99A (blaue Kurve) und C105A (orange Kurve) wurden anaerob bei 17 °C vermessen. Die molaren Massen der Eichproteine sind angegeben Albumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom C (12,4 kDa). Die Flussrate betrug 0,5 ml/min und das Hohlraumvolumen V_0 ist gekennzeichnet.

Für eine exakte Bestimmung der Proteingrößen, wurde die Säule mit den 5 verschiedenen Eichproteinen Albumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom C (12,4

kDa) (Gel Filtration Molecular Weight Markers Kit 12 kDa – 200 kDa, Sigma, Deutschland) kalibriert. Die Trennung erfolgte anaerob in einer Anaerobenkammer der Firma Coy Lab bei 17 °C. Es wurden jeweils 100 µl einer 200 µM Proteinlösung injiziert und die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

Die errechnete Molekulare Masse von RirA aus *D. shibae* beträgt 16,136 kDa. Alle RirA Proteine eluierten bei ca. 16 ml (Abb. 38) was einer Molekularen Massen von 38.000 Da +/- 3000 Da entspricht. Somit laufen die RirA Proteine in etwa auf der Höhe eines Dimers mit einer errechneten Größe von 32,272 kDa. Die leichte Erhöhung der gemessenen molekularen Masse im Vergleich zur abgeleiteten molekularen Masse könnte aufgrund einer asymmetrischen Struktur entstanden sein. Proteine die keine globuläre, sondern eine eher lang gestreckte Struktur besitzen wandern in der analytischen GPC schneller und erscheinen damit größer. Für einige Mitglieder der Rrf2 Familie konnte die Struktur bereits gelöst werden und zeigen diese langgestreckte Dimerform z.Bsp CymR (Shepard *et al.*, 2011). Daher könnte der Elutionspeak bei ca. 38 kDa einer dimeren Form des RirA Proteins entsprechen. Die Absorptionsschultern bei einem Elutionsvolumen von 13 ml und 14 ml ist auf Aggregate zurückzuführen, die bereits während der Reinigung entstanden sein können oder aber im Verlauf der Probenvorbereitung für die analytische GPC.

Die Ergebnisse der analytischen GPC zeigen neben der Dimerform für das RirA Wildtypprotein auch die dimeren Formen für die Mutantenproteine. Somit ist die Koordination eines Fe-S Clusters als Kofaktor nicht ausschlaggebend für die Ausbildung der Dimerstruktur.

Abschließend lassen die Auswertungen der UV/Vis, ESR und Mössbauer Spektroskopie zusammen mit den Ergebnissen der Eisen- und Schwefelbestimmungen nur die Annahme zu, dass es sich bei dem Kofaktor des dimeren RirA Proteins aus *D. shibae* um ein sauerstofflabiles, redox-inaktives $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Cluster handelt, welches durch die drei Cysteine Cys91, Cys99 und Cys105 koordiniert wird.

4.3.1 Funktionelle DNA *in vitro* Bindestudien von RirA an ein 155 mer Promotorfragment mittels Gelretardationsanalyse

Um die Bindung des anaerob gereinigten RirA Proteins an das mit Digoxigenin markierte 155 bp lange Promotorfragment zu testen, wurden steigende Menge des RirA Proteins hinzugegeben und inkubiert. Die RirA-DNA Komplexe wurden anschließend unter anaeroben Bedingungen über ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach einem erfolgten Kontaktblot auf eine Nylonmembran und anschließendem Blocking erfolgte die Immunodetektion. Hierbei wurde die Membran mit einem DIG-spezifischen Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist, inkubiert. Durch die Zugabe von CDP Star, welches durch die alkalische Phosphatase umgesetzt wird, kommt zu einer Lichtreaktion. Diese Lichtreaktion kann nach der Inkubation in der Chemilumineszenz-Anlage detektiert werden.

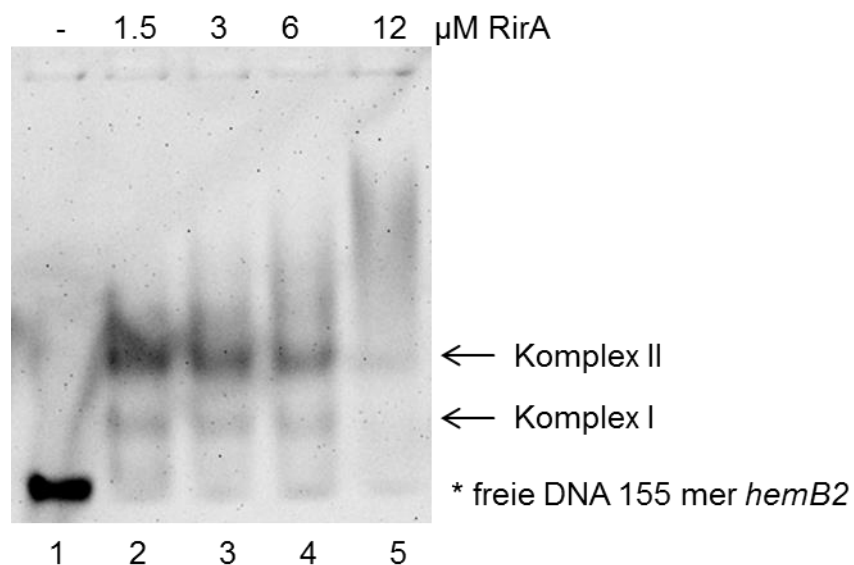


Abb. 40: Gelretardationsanalyse des gereinigten StrepII-RirA mit dem DIG markierten 155 bp langen Fragment des *hemB2* Promotors. Das DIG markierte 155 mer (0,2 pmol) wurde ohne Protein (Spur 1) und mit 1,5 µM (Spur 2), 3 µM (Spur 3), 6 µM (Spur 4) und 12 µM (Spur 5) anaerob gereinigtem StrepII-RirA Protein inkubiert. Nach der Detektion sichtbare Protein/DNA Komplexe sind mit Pfeilen markiert. Die ungebundene DNA mit einem Sternchen.

Komplexe aus Protein und DNA laufen im Gel deutlich langsamer als freie DNA und können so unterschieden werden. Daher wurde als Kontrolle in einem Ansatz nur markierte DNA ohne Protein eingesetzt, um die Laufhöhe der freien DNA von den Protein/DNA Komplexen zu unterscheiden (Abb. 40, Spur 1). Neben der Bande der freien DNA wurden bereits nach Zugabe von 1,5 µM RirA Protein 2 weitere retardierende Banden detektiert (Abb. 40, Spur 2). Mit zunehmender Menge an RirA Protein von 3 µM und

6 μM bleiben die Komplexe I und II erhalten (Abb. 40, Spur 3-4). Ab einer Proteinkonzentration von 12 μM (Abb. 40, Spur 5) werden die Banden für die Protein/DNA Komplexe I und II schwächer und es entstehen höher molekulare Aggregate aus Proteinen und DNA. Diese sind als grauer Schatten im oberen Teil von Abb. 40 Spur 5 zu erkennen. Die Bildung der Komplexe I und II weist auf eine Bindung des RirA Proteins an den Promotorbereich von *hemB2* hin.

4.3.2 Analyse der Bindungsfähigkeit von RirA mittels DNaseI-Footprintanalysen

Um den genauen Bereich der Bindung von RirA an den *hemB2* Promoter zu analysieren, wurden DNaseI-Footprintanalysen mit anaerob gereinigtem RirA Protein und einem einseitig DIG markierten 155 bp langen Promotorfragment von *hemB2* durchgeführt. Hierzu wurden 0.2 pmol Digoxigenin markiertes *hemB2* Promotorfragment von Position -99 bis +56 ausgehend vom möglichen Transkriptstart mit steigenden Mengen RirA Protein von 82 μM bis 546 μM inkubiert und anschließend einem DNaseI Verdau unterzogen. Auch hier wurde das DNA Fragment zur Kontrolle einmal ohne Zugabe von Protein eingesetzt. Nach dem DNaseI Verdau wurden die Proben auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Anschließend erfolgte ein Kontaktblot auf eine Nylonmembran und die Detektion der DIG-gelabelten DNA mittels einem DIG-Antikörper und CDP Star. Das Substrat CDP-Star wird durch die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase umgesetzt und es kommt zu einer Lichtreaktion. Diese Lichtreaktion kann nach der Inkubation in der Chemilumineszenz-Anlage detektiert werden.

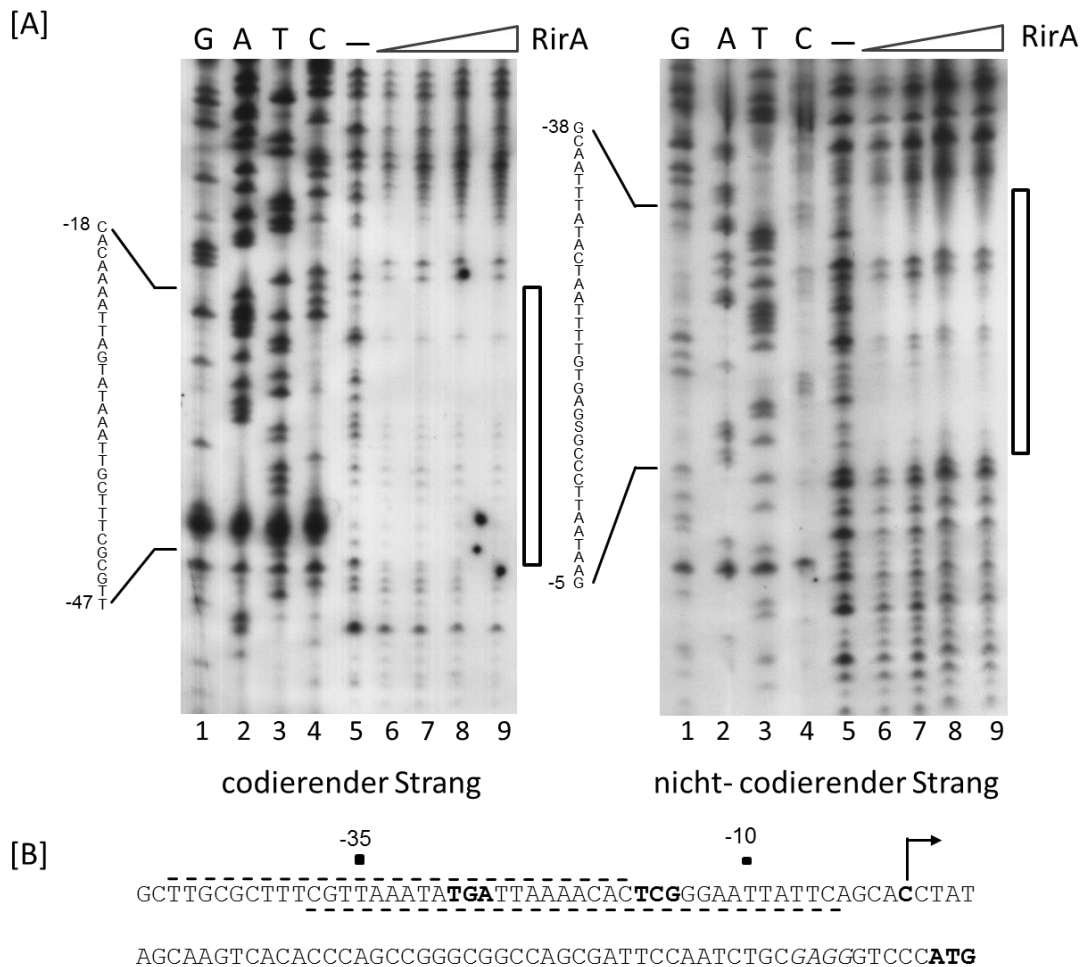


Abb. 41: DNaseI Protektionsanalyse des codierenden und nicht-codierenden DNA Strangs des *hemB2* Promoterfragments mit anaerob gereinigtem StrepII-RirA Protein. A: Dargestellt sind die Sequenzierreaktionen G, A, T und C (Spur 1-4) sowie die DNaseI Protektionsanalyse (Spur 6-9). Die durch das gebundene Protein geschützten Bereiche sind mit weißen Boxen unter Angabe der geschützten Sequenz gekennzeichnet. Für die DNaseI-Footprintexperimente wurde jeweils 0,2 pmol DIG-markiertes DNA Fragment ohne RirA Protein (Spur 5) und mit 82 μ M (Spur 6), 136 μ M (Spur 7), 273 μ M (Spur 8) und 546 μ M (Spur 9) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation und DNaseI Fragmentierung wurde die Ansätze in einem denaturierenden Acrylamid Harnstoffgel elektrophoretisch getrennt. B: Es wurde ein DNA Fragment verwendet welches die Position -99 bis +56 des *hemB2* Promoters im Bezug zum Transkriptionsstart präsentiert. Die -10 und -35 Regionen sind als schwarze Kästchen dargestellt. Der mögliche Transkriptstart ist durch einen Pfeil markiert.

Die Footprintanalysen zeigten, dass ohne die Zugabe von RirA Protein ein gleichmäßiges Fragment Muster bei dem verdauten *hemB2* Fragment entsteht (Abb. 41, Spur 5). Nach der Zugabe steigender Mengen an RirA Protein von 82 μ M (Abb. 41, Spur 6) über 136 μ M (Abb. 41, Spur 7) und 273 μ M (Abb. 41, Spur 8) bis 546 μ M (Abb. 41, Spur 9) war deutlich zu erkennen, dass einige Bereiche des Promotorfragments durch das gebundene RirA Protein vor dem Verdau geschützt wurden. Das war durch die deutlich schwächeren Banden im Vergleich mit dem Verdau der DNA ohne Protein erkennbar. Diese

geschützten Bereiche werden durch eine Box markiert und wurden sowohl auf dem codierenden als auch auf dem nicht-codierenden Strang gefunden (Abb. 41). Durch die Sequenzierung des Promotorfragments und Trennung in die einzelnen Basen konnte der Bindungsbereich direkt der Promotorsequenz zugeordnet werden. In der DNA Sequenz wurde der geschützte Bereich des codierenden Strangs von Position -18 bis -47 in Bezug zum möglichen Transkriptionsstart durch Oberstriche und der geschützte Bereich des nicht-codierenden Strangs von Position -5 bis -38 in Bezug zum möglichen Transkriptionsstart durch Unterstriche markiert (Abb. 41 B). Ein Überlapp war im Bereich der Positionen -38 bis -17 in Bezug zum möglichen Transkriptionsstart zu finden.

Durch die Footprintanalysen konnte der genauere Bereich der Bindung auf eine Länge von 42 bp von Position -47 bis -5 zum Transkriptstart eingeschränkt werden. Innerhalb dieses Bereichs findet die Bindung von RirA an den *hemB2* Promoter statt. Zusätzlich ist in diesem Bereich auch die postulierte Bindestelle von RirA mit dem Motiv 5'-TGA-N₉-TCG-3' enthalten.

4.3.3 Analyse der Bindungsfähigkeit an ein verkürztes 41 mer *hemB2* Promotorfragment

Da die Footprintanalysen erfolgreich den Bereich der RirA Bindung an den *hemB2* Promoter einschränken konnten, wurden erneut EMSA Experimente mit RirA Protein durchgeführt, um die Bindung an ein verkürztes *hemB2* Promotorfragment zu testen. Hierzu wurde ein Bereich des Promoters gewählt in dem die potentielle Bindestelle 5'-TGA-N₉-TCG-3' mittig liegt und jeweils 13 bp davor und dahinter zusätzlich gewählt. Dieses Fragment besitzt eine Länge von 41 bp und deckt den Bereich von Position -42 bis -1 zum möglichen Transkriptionsstart ab und nahezu den gesamten Bereich des gefundenen Footprints.

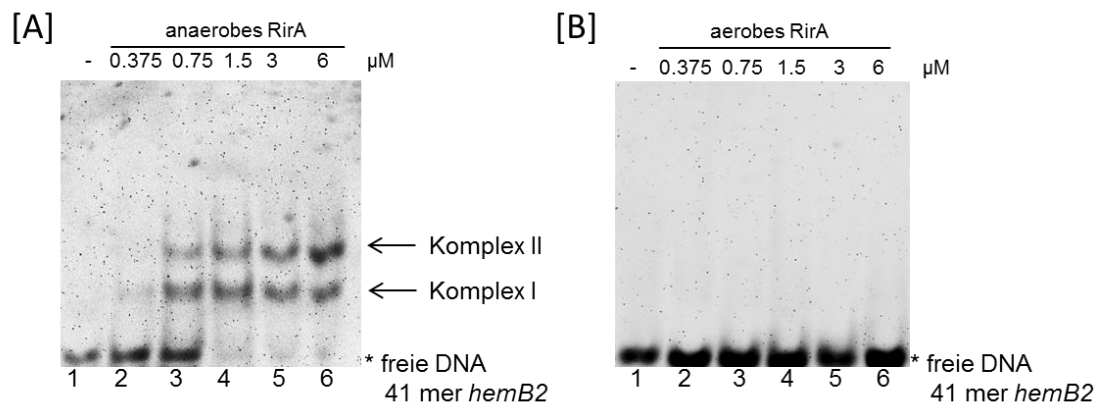


Abb. 42: Gelretardationsanalyse des anaerob und aerob gereinigten StrepII-RirA mit dem DIG markiertem 41 bp langem Fragment des *hemB2* Promotors. Das DIG markierte 41 mer (0,2 pmol) wurde ohne Protein (Spur 1) und mit 0,375 μM (Spur 2), 0,75 μM (Spur 3), 1,5 μM (Spur 4), 3 μM (Spur 5) und 6 μM (Spur 6) anaerob (A) bzw. aerob (B) gereinigtem StrepII-RirA Protein inkubiert. Nach der Detektion sichtbare Protein/DNA Komplexe sind mit Pfeilen markiert. Die ungebundene DNA mit einem Stern.

Ohne Zugabe von RirA Protein war nur die freie, ungebundene DNA des *hemB2* Fragments zu erkennen (Abb. 42 A, Spur 1). Nach der Zugabe von 0,375 μM anaerob gereinigtem RirA Protein war eine leichte Bande auf der Höhe von Komplex I zu erkennen (Abb. 42 A, Spur 2). Bei einer Verdopplung der Proteinmenge auf 0,75 μM (Abb. 42 A, Spur 3) entstanden die zwei charakteristischen Komplex Banden I und II, die bereits bei den EMSA Experimenten mit den 155 bp langen Fragmenten gezeigt wurden. Mit zunehmender Proteinmenge bis zu 6 μM (Abb. 42 A, Spur 4-6) wurden die Banden der Komplexe stärker und die Menge an freier DNA nahm ab.

Um den Einfluss des $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$ auf die Bindung zu untersuchen, wurde das identische Experiment mit aerob gereinigtem RirA Protein durchgeführt. In diesem Experiment war unabhängig von der eingesetzten Proteinmenge keine Bindung des Proteins an die DNA zu erkennen (Abb. 42 B, Spur 2-6). Wie bereits gezeigt wurde, ist der Fe-S Kofaktor Sauerstoff labil und somit ist ein intaktes $[\text{3Fe-4S}]$ Zentrum für die Aktivität und Bindung des RirA Regulators aus *D. shibae* dringend erforderlich.

Um die für die Bindung von RirA an die DNA nötigen Basen zu ermitteln, wurden verschiedenen Mutationen in die DNA-Sequenz des 41 bp langen *hemB2* Promoter Fragments eingefügt (Abb. 43). Neben dem postulierten Motiv 5'-TGA-N₉-TCG-3' sind noch zwei weitere potentielle Motive mit der palindromischen Sequenz 5'-TTAA-N₂₀-AATT-3' (AC) und 5'-TTAA-N₁₀-AATT-3' (BC) zu erkennen (Abb. 43). Diese wurden ebenfalls durch Mutationen teilweise oder komplett verändert (Abb. 43, rot).

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	Bindung
<i>hemB2</i> 41mer	CTTTCGTTAAATATGA	TTAAAACACT	TCGGGAATTATTCAGC	+
<i>hemB2</i> 41mer_mut1	CTTTCGTTAAATACAG	TTAAAACACGTC	GGAATTATTCAGC	+
<i>hemB2</i> 41mer_mut2	CTTTCGCGAAATACAG	TTAAAACACGTC	GGAAGCATTTCAGC	-
<i>hemB2</i> 41mer_mut3	CTTTCGTTAAATATGA	CGAAAACACT	CGGGAGCATTTCAGC	-
<i>hemB2</i> 41mer_mut4	CTTTCGCGAAATATGAT	TAAAACACT	CGGGAGCATTTCAGC	-
<i>hemB2</i> 41mer_mut5	CTTTCGTTAAATATGAT	TAAAACACT	CGGGAGCATTTCAGC	-/+
<i>hemB2</i> 41mer_mut6	CTTTCGCGAAATATGAT	TAAAACACT	CGGGGAATTATTCAGC	+
<i>hemB2</i> 41mer_mut7	CTTTCGTTAAATATGA	CGAAAACACT	CGGGGAATTATTCAGC	-

Abb. 43: Übersicht der verwendeten 41 mer Promoter Fragmente mit den eingeführten Mutationen. Innerhalb des Wildtyp Fragments (41 mer) ist die postulierte Bindestelle hervorgehoben und die potentiellen neuen Bindestellen durch Pfeile markiert. Die einzelnen Positionen der neuen potentiellen Bindestellen sind mit den Buchstaben A, B und C, gekennzeichnet. Die eingeführten Mutationen an den verschiedenen Positionen sind rot markiert. Die Bindungsfähigkeit der einzelnen Fragmente mit dem RirA Protein ist durch ein + gekennzeichnet. Ein - kennzeichnet die fehlende Bindung.

Die erste Mutation (Abb. 43, mut1) wurde in das postulierte Bindemotiv 5'-TGA-N₉-TCG-3' eingefügt. Hierzu wurden die hoch konservierten Basen TGA ausgetauscht zu CAG und die Basen TCG des Motivs zu GTC. Das postulierte Bindemotiv wies nach dem Basenaustausch die Sequenz 5'-CAG-N₉-GTC-3' auf. EMSA Analysen mit diesem Fragment zeigten, dass eine Bindung des RirA Proteins an die DNA immer noch möglich war und die resultierenden Komplexe I und II den EMSA Analysen mit dem *hemB2* 41 mer Fragment entsprachen (Abb. 44). Dasselbe Ergebnis wurde erzielt, nach der Insertion der Mutation im Bereich A (Abb. 43, Abb. 44, mut 6) der potentiellen neuen Bindestelle. Hierbei wurden die zwei Thyminе gegen ein Guanin und ein Cytosin ausgetauscht. Analog wurden auch in den Bereichen B und C immer zwei Thyminе gegen ein Guanin und ein Cytosin mutiert. Neben den eingefügten Mutationen in der postulierten Bindestelle 5'-TGA-N₉-TCG-3' und der eingefügten Mutation im Bereich A, wurde im nächsten Schritt die potentielle neue Bindestelle mutiert, in dem zusätzlich zum Bereiche A auch der Bereich C verändert worden ist (Abb. 43, mut 2). Diese Mutationen resultierten im Verlust einer spezifischen Bindung des RirA Proteins an die DNA (Abb. 44, mut 2). Dies trifft ebenfalls für die eingefügten Mutationen im Bereich B und C (Abb. 43, Abb. 44, mut 3), in den Bereichen A und C (Abb. 43, Abb. 44, mut 4) sowie der einzelnen Mutation im Bereich B (Abb. 43, Abb. 44, mut 7) zu. Eine einzelne Mutation im Bereich C (Abb. 43, mut 5) der potentiellen Bindestelle führte zu einer Verschiebung des Komplex I auf die Höhe des eigentlich charakteristischen Komplex II (Abb. 44, mut 5). Bei einem Vergleich aller EMSA Experimente wurde deutlich, dass Mutationen im

Bereich A, B und C der potentiellen Bindestelle zu einem Verlust der Protein/DNA Interaktion führen. Eine genauere Betrachtung zeigte, dass Mutationen im Motiv 5'-TTAA-N₁₀-AATT-3' also im Bereich BC für den Verlust der Bindung verantwortlich waren. Somit konnte eine neue Bindestelle für den RirA Regulator definiert werden mit dem Bindemotiv 5'-TTAA-N₁₀-AATT-3'.

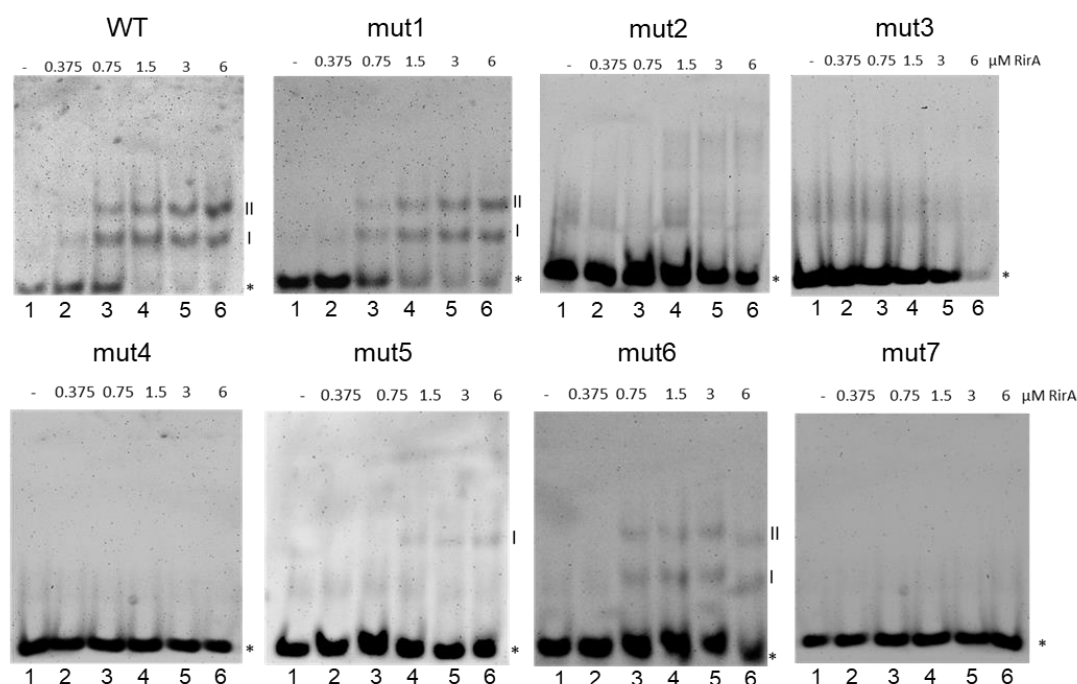


Abb. 44: Gelretardationsanalyse des anaerob gereinigten StrepII-RirA mit dem DIG markiertem 41 bp langem Fragment des *hemB2* Promotors nach Insertion verschiedener Mutationen. Das DIG markierte Wildtyp 41 mer (0,2 pmol) sowie die 41 mer Fragmente mit den eingeführten Mutationen in den Bindemotiven wurden ohne Protein (Spur 1) und mit 0,375 µM (Spur 2), 0,75 µM (Spur 3), 1,5 µM (Spur 4), 3 µM (Spur 5) und 6 µM (Spur 6) anaerob gereinigtem StrepII-RirA Protein inkubiert. Nach der Detektion sichtbare Protein/DNA Komplexe sind mit römischen Zahlen (I und II) markiert, die ungebundene DNA mit einem Stern.

4.4 Kristallisationsexperimente mit dem anaerob gereinigten RirA Protein aus *D. shibae*

Nachdem erfolgreich ein sauerstofflabiles, redox-inaktives und für die Bindung an DNA wichtiges [3Fe-4S] Cluster spektroskopisch als Kofaktor für den RirA Regulator aus *D. shibae* charakterisiert werden konnte, sollten im Folgenden Kristallisationsexperimente durchgeführt werden, um die genaue Struktur von RirA aufzuklären. Hierfür wurden Proteinkonzentrationen von 7 mg/ml und 9 mg/ml Protein in einem 100 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl und 5 mM DTT Puffer für die Kristallisationsexperimente verwendet. Durch die kommerziell erhältlichen Screens JCSG Core Suite II, JCSG Plus Suite

und der Cryos Suite von Nextal (Qiagen®, Deutschland) konnte eine große Anzahl an verschiedenen Pufferbedingungen, Fällungsmitteln und Additiven getestet werden. Für das anaerob gereinigte RirA Protein wurde die *sitting drop* Methode in einer 96 well Platte unter anaeroben Bedingungen angewendet. Hierzu wurde das Reservoir mit 60 µl Kristallisationspuffer befüllt und 1 µl gereinigtes RirA Protein der jeweiligen Konzentration mit 1 µl des Kristallisationspuffers in der Kristallisationsschale vermischt. Die Kristallisationsansätze wurden für 3 Tage bis hin zu mehreren Wochen in einer anaeroben Box der Firma Coy Lab inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten unter dem Mikroskop angeschaut. Bei ungeeigneten Pufferbedingungen oder zu hoch konzentriertem RirA Protein kommt es schnell zur Bildung von Präzipitat. Bereits kurz nach Ansätzen der Kristallisationsplatten waren ca. 65 % des Proteins mit einer Konzentration von 9 mg/ml ausgefallen im Vergleich zu ca. 55 % in dem Ansatz mit einer Proteinkonzentration von 7 mg/ml. Bei der Analyse des Präzipitats fällt auf, dass das RirA Protein je nach Bedingung unterschiedliche Farben annimmt (Abb. 45). Durch die Braunfärbung des RirA Proteins weist das Präzipitat ebenfalls eine braune Färbung auf.



Abb. 45: Präzipitat des ausgefallenen RirA Proteins. Das anaerob gereinigte RirA Protein bildet unterschiedlich farbiges Präzipitat, in verschiedenen Brauntönen.

Eine erste Betrachtung der Kristallisationsansätze nach 3 Tagen zeigte, dass sich bei beiden Proteinkonzentrationen in weiteren Bedingungen Präzipitat gebildet hat. Zu diesem Zeitpunkt waren noch keine kristallinen Strukturen zu erkennen. Auch eine Betrachtung nach 2, 4 und 8 Wochen lieferte keine neuen Ergebnisse.

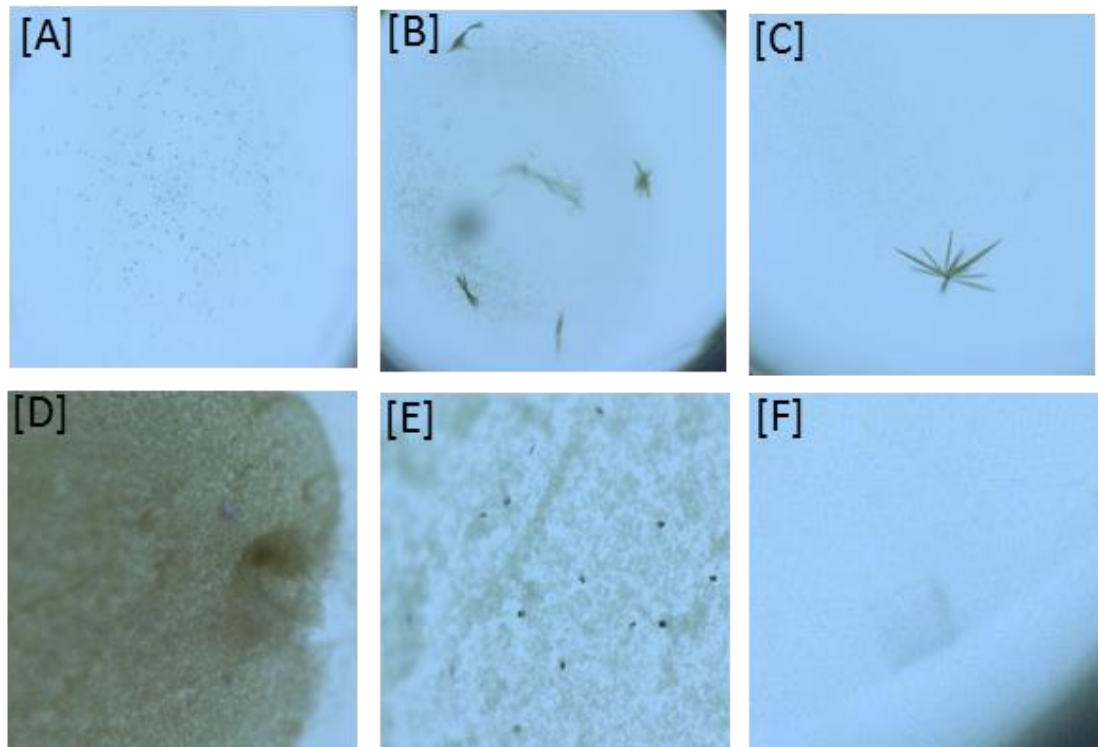


Abb. 46: Kristalline Strukturen des anaerob gereinigten RirA Proteins. Nach einer Inkubationszeit von ca. 6 Monaten waren in der Bedingung mit 9 mg/ml verschiedenartige kristalline Strukturen des RirA Proteins zu erkennen. A: Ausbildung kleiner kugelförmiger brauner Kristallstrukturen in der Bedingung E10 des Cryos Suites mit 0,0085 M Nickelchlorid, 0,085 M Tris pH 8,5, 0,85 M Lithiumsulfat und 15 % (v/v) Glycerin. B und C: Bildung brauner nadelförmiger Strukturen, die sich zusammengelagert haben in der Bedingung H10 des Cryos Suites mit 1,6 M Natriumchlorid, 8 % (w/v) PEG 6000 und 20 % (v/v) Glycerin. D: Ausbildung lila gefärbter kleiner Kristalle im JCSG CoreII Suit in der Bedingung G4 mit 0,01 M Kobaltchlorid, 0,1 M Natriumacetat pH 4.6 und 1,0 M Hexandiol. E: Ausbildung sehr kleiner, dunkel-brauner und quadratischer kristallinen Strukturen in der Bedingung A10 des JCSG Plus Suites mit 0,2 M Kaliumformiat pH 7,3 und 20 % PEG 3350. F: Bildung eines farblosen großen viereckigen Kristalls in der Bedingung F8 des JCSG Plus Suites mit 2,1 M DL-Äpfelsäure pH 7.0.

Erst nach einer Inkubationszeit von ca. 6 Monaten waren kristalline Strukturen in einigen Bedingungen zu finden (Abb. 46). In der Bedingung E10 des Cryos Suites mit 0,0085 M Nickelchlorid, 0,085 M Tris pH 8,5, 0,85 M Lithiumsulfat und 15 % (v/v) Glycerin sind kleine kugelförmige, hellbraune Ansammlungen von Proteinkristallen zu erkennen (Abb. 46, A). Im selben Screen in der Bedingung H10 mit 1,6 M Natriumchlorid, 8 % (w/v) PEG 6000 und 20 % (v/v) Glycerin haben sich dunkel-braune Nadelstrukturen ausgebildet und zusammengelagert (Abb. 46, B und C). Im JCSG CoreII Suit in der Bedingung G4 mit 0,01 M Kobaltchlorid, 0,1 M Natriumacetat pH 4.6 und 1,0 M Hexandiol kam es zur Ausbildung kleiner, viereckiger lila Kristallstrukturen, sie sich aus dem Präzipitat heraus gebildet haben (Abb. 46, D). Zur Ausbildung sehr kleiner, dunkel-brauner und quadratischer kristallinen Strukturen kam es in der Bedingung A10 des JCSG Plus Suites mit 0,2 M Kaliumformiat pH 7,3 und 20 % PEG 3350 (Abb. 46, E). Im identischen Screen

in der Bedingung F8 mit 2,1 M DL-Äpfelsäure pH 7.0 formte sich ein recht großer, allerdings farbloser, quadratischer Kristall aus (Abb. 46, F). Aufgrund der fehlenden Braunfärbung handelt es sich bei diesem Kristall mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Salzkristall, der sich aus dem Fällungsmittel heraus gebildet hat. Die anderen gefundenen kristallinen Strukturen waren für eine weitere Analyse ebenfalls nicht verwendbar, da die Strukturen zu klein bzw. zu ungeordnet für einen richtigen Kristall waren. Um für Röntgenstruktur Analysen geeignete Kristalle zu erhalten, müssten die oben genannten Bedingungen verfeinert werden und zusätzlich weitere Bedingungen getestet werden.

4.5 Funktionelle *in vitro* Untersuchung des eisenabhängigen Regulators IscR aus *D. shibae*

4.5.1 Heterologe Produktion und Reinigung von IscR

Der Transkriptionsregulator IscR gehört zur Familie der Rrf2 Transkriptionsfaktoren und ist an der eisenabhängigen Regulation von Genen beteiligt. Für *E. coli* wurde bereits gezeigt, dass der IscR Regulator über die Koordination eines [2Fe-2S] Clusters Eisenmengen messen kann und die Gene der Fe-S Biogenese unter Eisenmangel hemmt (Schwartz *et al.*, 2001). In *R. sphaeroides* ist der IscR Regulator an der eisenabhängigen Regulation von über 100 Genen beteiligt und es wird postuliert, dass er ebenfalls ein Fe-S Cluster bindet (Remes *et al.*, 2015). Da der IscR Regulator aus *D. shibae* ebenso wie der IscR Regulator aus *R. sphaeroides* nicht die im IscR Regulator aus *E. coli* gefundenen Cysteinreste zur Koordination des Fe-S Clusters besitzen, sollte der Kofaktor von IscR aus *D. shibae* identifiziert werden. Ebenso wie bei RirA ist IscR aus *D. shibae* ein Regulator der Transkription und deswegen nur in geringen Mengen in der Zelle vorhanden. Für die heterologe Produktion in *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL Zellen wurde das *iscR* Gen daher unter die Kontrolle eines IPTG induzierbaren Promotors in den pET52b Vektor kloniert. Das IscR Protein wird so als Fusionsprotein mit N-terminalem StrepII-Tag produziert. Hierzu wurden die Zellen aus einer Vorkultur mit einer OD₅₇₈ von 0,05 inokuliert und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Dann erfolgte die Induktion mit 100 µM IPTG. Die weitere Produktion wurde bei 25 °C und 180 rpm durchgeführt. Alle weiteren Schritte der folgenden Reinigung wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden in Erntebecher überführt, für 2 h im Anaerobenzelt inkubiert,

zentrifugiert und anschließend mittels French Press aufgeschlossen. Die unlöslichen Proteine und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation von den löslichen Bestandteilen getrennt. Der cytosolische Teil wurde auf eine Strep-Tactin® Tropfsäule mit einem Volumen von 2 ml gegeben, damit das StrepII-IscR Protein von den anderen löslichen Proteinen durch Bindung an das Säulenmaterial getrennt werden kann. Anschließend erfolgte die Elution des StrepII-IscR Proteins mit 2,5 mM d-Desthiobiotin. Zur Dokumentation der Produktion und Reinigung wurden Proteinproben der verschiedenen Reinigungsschritte auf einer 15 % SDS PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

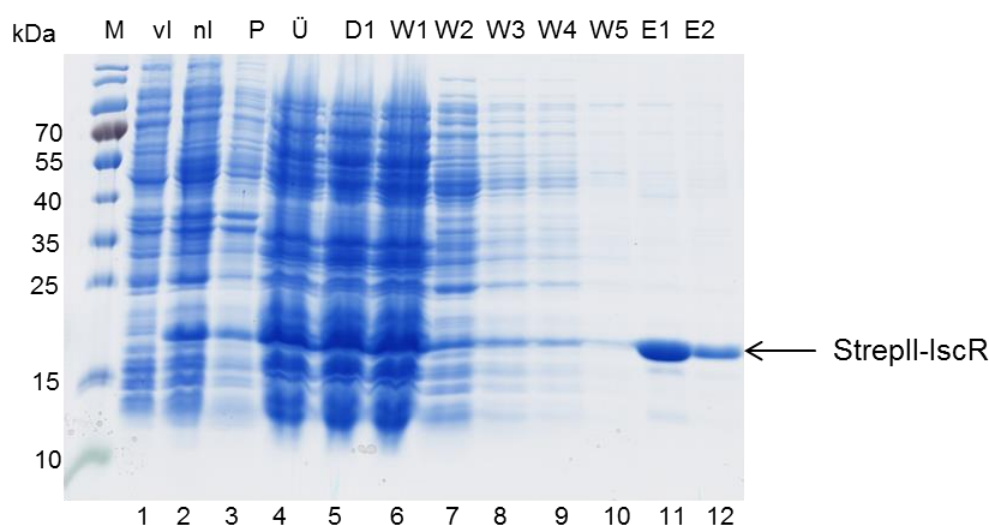


Abb. 47: Produktion und Reinigung des StrepII-IscR Fusionsproteins. In der Spur M ist der Marker Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Massachusetts) aufgetragen. Spur 1 zeigt den Rohextrakt des *E. coli* Expressionsstammes vor Induktion der StrepII-IscR Produktion (vl). Spur 2 zeigt den Rohextrakt des StrepII-IscR Proteins 16 h nach Induktion mit 100 μ M IPTG (nl). In Spur 3 ist die unlösliche Zellfraktion (P), in Spur 4 die lösliche, cytoplasmatische Zellfraktion nach der Lyse der Produktionszellen zu sehen (Ü). Spur 5 zeigt den Durchfluss der Säule und somit die Menge an ungebundenem Protein (D1). Spur 6, Spur 7, Spur 8, Spur 9 und Spur 10 zeigen die unterschiedlichen Waschschritte, bei denen ungebundene Proteine von der Säule gewaschen wurden (W1-W5). In den Spuren 11 und 12 sind die Elutionsfraktionen des StrepII-IscR Proteins zu finden (E1-E2). Die Proteinfractionen wurden zur gelelektrophoretischen Größenfraktionierung auf einer 15 % SDS Page aufgetragen und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die molekulare Masse der Markerproteine ist angegeben und der Pfeil markiert das StrepII-IscR Protein mit einer relativen molekularen Masse von ca. 19 kDa.

Ein Vergleich der Spuren vor und nach Induktion zeigten, dass nach einer 20 stündigen Inkubation deutlich eine zusätzliche Bande mit einer relativen molekularen Masse von ca. 19 kDa zu erkennen ist (Abb. 47, Spur 1 und 2). Dies entspricht der erwarteten Größe von 19,33 kDa des StrepII-IscR Proteins. Nur ein geringer Teil des produzierten Proteins ist in der unlöslichen Fraktion zu finden (Abb. 47, Spur 3). Der höhere Anteil des Proteins befindet sich in der löslichen Fraktion (Abb. 47, Spur 4). Die Durchflussfraktion zeigt, dass die meisten löslichen Proteine nicht an die Säule binden konnten und auch StrepII-

IscR Protein im Durchfluss zu finden ist (Abb. 47, Spur 5). Die verschiedenen Waschschrte von W1 bis W5 zeigen deutlich dass unspezifische, nicht gebundene Proteine gut von der Säule gewaschen werden konnten, jedoch auch StrepII-IscR Protein in den Waschfraktionen zu finden ist (Abb. 47, Spur 6-10). Leider ist der Verlust von nicht gebundenem StrepII-IscR Protein im Durchfluss und in den Waschschrten in der Summe relativ hoch. Die Elution erfolgte jeweils in 2 ml Elutionsvolumen mit 2,5 mM d-Desthiobiotin. Die Elutionsfraktionen sind farblos und zeigen mit ca. 80 % das gereinigte StrepII-IscR Protein als Hauptbande bei ca. 19 kDa (Abb. 47, Spur 11 und 12). Aus 1 L Zellkultur konnte ca. 0,6 mg StrepII-IscR Protein gereinigt werden. Dies ist relativ wenig, für das verwendete Strep-Tactin® Superflow® high capacity Säulenmaterial, welches eine Ausbeute bis zu 7 mg Protein pro ml Säulenmaterial ermöglicht. Die geringe Ausbeute des StrepII-IscR Proteins könnte mit einer Fehlfaltung zusammen hängen, da die Spuren 5-10 der SDS PAGE einen Verlust an StrepII-IscR Protein durch fehlende Bindung zeigen. Dies könnte dafür sprechen, dass das Protein bzw. der fusionierte StrepII-Tag nicht korrekt gefaltet sind und der StrepII-Tag daher nicht an das Säulenmaterial binden kann. Eine Optimierung der Produktionsbedingungen könnte zu einer erhöhten Ausbeute führen.

4.5.2 Spektroskopische Analysen zur Identifikation des Kofaktors

Da es sich bei IscR aus *D. shibae* um einen Regulator der Eisenaufnahme handelt, wird ähnlich wie beim IscR aus *E. coli* und *R. sphaeroides*, ein eisenabhängiger Kofaktor vermutet (Fleischhacker *et al.*, 2012; Remes *et al.*, 2015). Um zu testen ob der IscR Regulator aus *D. shibae* ebenfalls ein Fe-S Cluster als Kofaktor koordiniert, wurde ein UV/Vis Spektrum aufgenommen. Proteine, die ein Fe-S Cluster gebunden haben, zeigen im UV/Vis typischerweise eine Schulter bei 420 nm (Khoroshilova *et al.*, 1995).

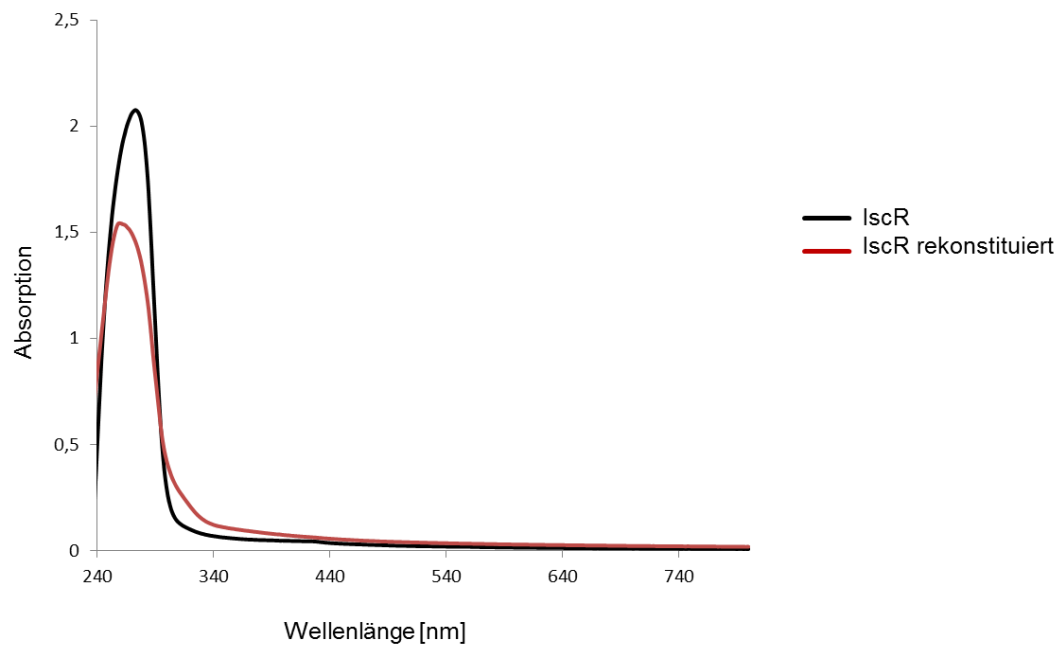


Abb. 48: UV/Vis spektroskopische Analyse von IscR vor und nach der Rekonstitution. Das StrepII-IscR Protein wurde 25 °C produziert, anaerob gereinigt und spektroskopisch im UV/Vis vermessen (schwarze Kurve). Nach der Rekonstitution mit Eisenammoniumcitrat und Lithiumsulfid wurde das Protein erneut vermessen (rote Kurve).

Das gereinigte StrepII-IscR Protein zeigte keine Absorption im Bereich von 420 nm, welche typisch für Fe-S Cluster bindendes Protein wäre (Abb. 48). Da es bei heterologen Proteinproduktionen zu Problemen im Aufbau und Einbau von Fe-S Kofaktoren kommen kann, wurde versucht durch die Zugabe von Eisenammoniumcitrat und Lithiumsulfid ein Fe-S Cluster zu rekonstituieren. Durch die Rekonstitution können Fe-S Cluster in das Protein eingebaut bzw. der Umbau von Fe-S Clustern gefördert werden. Das [2Fe-2S] Cluster des IscR Regulators aus *E. coli* konnte so bereits erfolgreich rekonstituiert werden (Santos *et al.*, 2014). Im Fall des StrepII-IscR Proteins kam es jedoch zur Bildung von Eisensulfid, welches irreversibel an das Protein bindet und somit zum Ausfallen des Proteins führt. Um das aggregierte Protein von dem noch löslichen Protein zu entfernen wurde die Proteinlösung zentrifugiert, anschließend konzentriert und erneut im UV/Vis Spektrometer vermessen. Nach der Rekonstitution war keine erhöhte Absorption bei 420 nm zu erkennen (Abb. 48). Somit konnte kein Fe-S Cluster als Kofaktor des IscR Regulators von *D. shibae* nachgewiesen werden.

Eine Betrachtung verschiedener IscR Proteinsequenzen zeigt die starke Homologie von *D. shibae* IscR zu IscR Proteinen anderer Alphaproteobakterien. Das IscR Protein aus *D. shibae* weist eine Sequenzhomologie von ca. 74 % mit dem IscR Protein aus *Phae-*

obacter gallaeciensis, ca. 72 % mit dem IscR aus *Roseobacter denitrificans* und *Roseobacter litoralis*, und ca. 69 % mit dem IscR Protein aus *Rhodobacter sphaeroides*. Das IscR Protein aus *D. shibae* besitzt ebenso wie die anderen IscR Proteine der Alphaproteobakterien nur ein Cystein (Abb. 49). Für den IscR Regulator aus *R. sphaeroides* wurde angenommen, dass über dieses konservierte Cystein ein Fe-S Cluster koordiniert wird (Remes *et al.*, 2015).

Möglicherweise kann das IscR Protein aus *D. shibae* ein Häm als Kofaktor binden. Vom Irr Regulator in Rhizobien ist bekannt, dass er in der Lage ist über die Koordination eines Häms den Gehalt an Eisen in der Zelle zu bestimmen (Small *et al.*, 2008). Die Koordination eines Häms kann über verschiedene Sequenzmotive, die ein Cystein beinhalten, erfolgen die sogenannten „heme regulatory motifs“ (HRM) (Schubert *et al.*, 2015). Diese HRM bestehen aus einem Cystein-Prolin-Dipeptid. Aminosäure Sequenzvergleiche der IscR Regulatoren aus Alphaproteobakterien zeigen ein konserviertes CP Motiv (Abb. 49, gelb). In anderen Studien wurde bereits ein CP-Motiv als Häm-Bindungsmotiv identifiziert (Kühl *et al.*, 2013). Neben dem HRM Motiv kann Häm auch über Histidine koordiniert werden (Douglas & Rousseau, 1992). In der Sequenz von IscR aus *D. shibae* finden sich drei Histidinreste, die im IscR aus *E. coli* nicht zu finden sind (Abb. 49, grau).

```

RDIscR      MKLSTKGRYAMVALADIAMQ--PQDKLVSLGDIATRQAISLAYLEQLFVKLRRRAELVASV 58
RLIscR      MKLSTKGRYAMVALADIAMQ--PGDKLVSLGDIATRQAISLAYLEQLFVKLRRADLVTSV 58
PGIscR      MKLSTKGRYAMVALADIALQ--PEDSLVVLGDISKRQDISLPYLEQLFVKLRRSGLVSV 58
DSIscR      MKLSTKGRYAMVAMADLAE--PADKLVTLSEIAERQSISLTYLEQLFVKLRRAKLVESV 58
RSIscR      MKLSTKGRYAMVALVDLALAQKSGNELVSLAEVSKRQDISLPYLEQLFVKLRRAGLVEAV 60
*****.*:.*:*. :.:.** *.::: ** ***.*****.*: ** :*

RDIscR      RGPGGGYRLTRSPDIRVVEILSAVDETVDAMHKGAGASGGAGSGSAQSLTNRLWESLSA 118
RLIscR      RGPGGGYRLKRSPDIRVVEILSAVDETVDAMHKGAGASGGAGSGSAQSLTNRLWESLSA 118
PGIscR      RGPGGGYRLAQPSDIRVVDVLSAVDETVDAMHKGAGASGGAGSGSRAQSLTNRLWEGLSA 118
DSIscR      RGPGGGYRLARAPDAIRVSDVLQAVDETVSAMHTGAGASGAKSGSRAQSMNTNRLWEGLSA 118
RSIscR      RGPGGGYKLARAAESIRVSEIMEAVEETVNAMHTGAGASGGVSGSRAQSLTNRLWEGLSA 120
*****.*:.*:.. ** *:..**.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*

RDIscR      HVYVFLHQTRLSDVIANELAPCPAVPNLFDIVDEPTEPA----- 157
RLIscR      HVYVFLHQTRLSDVIANELAPCPAVPNLFDIVDEPSEHA----- 157
PGIscR      HVYVFLHQTRLSDVIENDLVPCPAVPTLFSVVDD----- 152
DSIscR      HVYVFLHQTRLSDVVTNQLTPCPAVPTLFTVVDDVDDADAVAN 162
RSIscR      HVYVFLHQTRLSDIKNEMRPCPAVPALFRVVDDED----- 155
*****.*:.*:.. ***** ** :*:

```

Abb. 49: Alignment von IscR Aminosäuresequenzen aus *D. shibae* und anderen Alphaproteobakterien. Das IscR Protein aus *D. shibae* (gi_157911942) wurde mit IscR Proteinen aus *Phaeobacter gallaeciensis* (PG, gi_568229729; 74,1 % Identität), *Roseobacter denitrificans* (RD; gi_109456034; 72,2 % Identität), *Roseobacter litoralis* (RL; gi_338757376; 72,2 % Identität) und *Rhodobacter sphaeroides* (RS;

gi_221160655; 68,9 %) verglichen. Identische Aminosäurereste wurden mit Sternchen markiert und homologe Aminosäurereste mit Punkten. Hoch konservierte Histidinreste sind grau markiert und das konservierte CP Motiv gelb. Das Alignment wurde mit ClustalW2 generiert (Larkin *et al.*, 2007).

Häm hat ein Fe^{2+} als Zentralatom gebunden und ist stark toxisch für Zellen. Durch Oxidation wird aus Häm Hämin mit einem Fe^{3+} als Zentralatom gebildet. Sobald Häm nicht mehr in einem Häm/Protein Komplex gebunden vorliegt, wird es sofort zu Hämin oxidiert, da freies Häm für die Zelle toxisch wäre. Häm kann durch die UV/Vis Spektroskopie durch spezifische Absorptionen identifiziert werden. Die UV/Vis Spektren von Häm und Hämin hängen stark von der Umgebung und der Bindung an Proteine ab. Im tiefen UV Bereich absorbiert ungebundenes Hämin im Bereich von 360-390 nm. Die Soret Banden liegen zwischen 400-436 nm, es können bis zu vier Q-Banden auftreten die zwischen 497-526 nm, 532-563 nm, 566-595 nm sowie 593-650 nm liegen. Je nach Bindung des Fe an den Porphyrin Ring entstehen unterschiedliche Spektren (Dayer *et al.*, 2010). Um eine potentielle Bindung von Häm an den IscR Regulator zu untersuchen, wurden zu 10 μM des anaerob gereinigten IscR Proteins steigenden Menge Hämin zugegeben und UV/Vis Spektren aufgenommen.

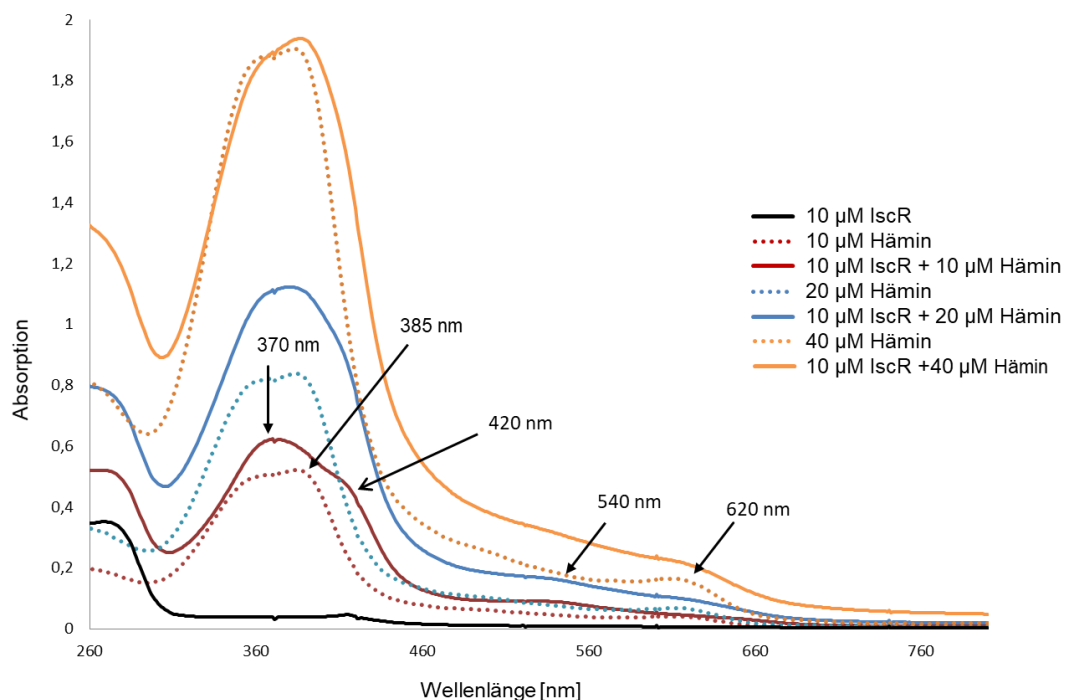


Abb. 50: UV/Vis Spektren von IscR nach Zugabe unterschiedlicher Hämin Mengen. UV/Vis Spektren von 10 μM anaerob gereinigtem IscR (schwarze Kurve) und nach der Zugabe von 10 μM Hämin (rote Kurve), 20 μM Hämin (blaue Kurve) und 40 μM Hämin (orange Kurve) wurden aufgenommen. Parallel wurden korrelierende Hämin Lösungen vermessen (gestrichelte Linie). Die relevanten Wellenlängen bei 370 nm, 385 nm, 420 nm, 540 nm und 620 nm sind durch Pfeile markiert.

Freies Hämin mit einer Konzentration von 10 μM zeigt einen breiten Peak bei 385 nm und einen leichten Peak bei 620 nm im Bereich der Q- Banden Absorption (Abb. 50). Diese Absorptionen bei 385 nm und 620 nm nehmen mit steigenden Hämin Mengen von 20 μM und 40 μM zu (Abb. 50). Nach der Zugabe von äquimolaren Mengen Hämin zu dem IscR Protein verändert sich das UV/Vis Spektrum. Die Absorption des Hämins bei 385 nm verlagert sich zu 370 nm und es entsteht eine neue Absorptionsschulter bei 420 nm (Abb. 50). Zusätzlich kommt es zu einer Verschiebung der Absorption im Bereich der Q-Bande von 620 nm zu 540 nm (Abb. 50). Dies spricht für eine Interaktion des Hämins mit dem IscR Protein. Eine Zugabe von Hämin im doppelten Überschuss bzw. im 4-fachen Überschuss zu 10 μM gereinigtem IscR Protein führt zu einer Überlagerung der Schulter bei 420 nm (Abb. 50).

Bei äquimolaren Mengen von IscR und Hämin kann eindeutig die Verschiebung der Absorption des Hämin von 385 nm zu 370 nm und das Entstehen einer Absorptionsschulter bei 420 nm detektiert werden. Diese Absorptionsänderungen sind ein erster Hinweis darauf, dass das IscR Protein aus *D. shibae* Häm binden kann.

Um die Bindung von Hämin an IscR weiter zu analysieren, wurden Elektronen Spin Resonanz (ESR) Experimente durchgeführt. Hierzu wurden 60 μM anaerob gereinigtes StrepII-IscR Protein in der ESR Spektroskopie vermessen. Das IscR Protein zeigt außer durch das Gerät auftretenden Hintergrundsignale keine messbaren, spezifischen Signale im ESR (ESR silent) (Abb. 51). Bei der Messung einer 60 μM Hämin Lösung erscheint das typische High Spin Signal für Fe (III) Verbindungen bei 6 g (Abb. 51). Nach der Inkubation von 60 μM IscR mit 60 μM Hämin erscheint ein verändertes ESR Signal. Es kommt zu einem Verlust des Signals bei 6 g. Stattdessen ist ein neues Signal bei 2,038 g zu erkennen (Abb. 51). Dieses Signal bei $g = 2,038$ ist typisch für Tryptophan Radikale. Das freie Fe(III)-Hämin mit dem Signal bei 6 g reagiert nach der Bindung des Proteins zu einem Fe(II)-Häm, welches kein ESR Signal ergibt und zu einem Protein Radikal an einem Tryptophan.

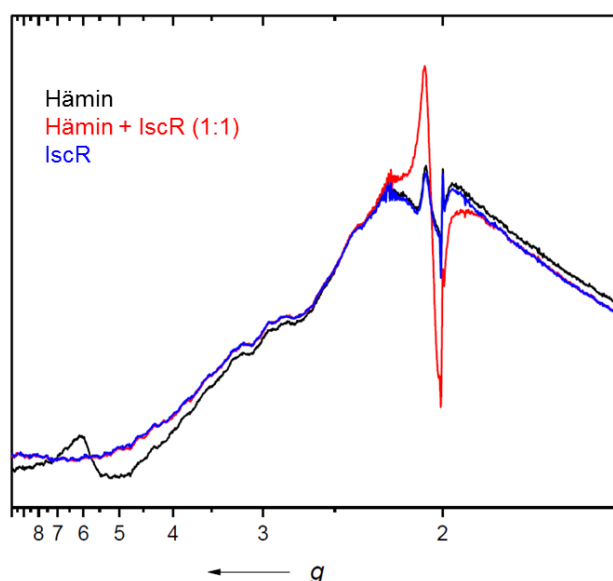


Abb. 51: ESR Spektren von IscR und Hämin. Das anaerob gereinigte StrepII-IscR Protein (60 μM) wurde im ESR vermessen (blaue Kurve) und in äquimolaren Mengen mit Hämin versehen (rote Kurve) und erneut vermessen. Das freie Hämin wurde ebenfalls vermessen (schwarze Kurve). Es wurde eine Mikrowellen Frequenz von 9.4 GHz verwendet mit einer Modulationsamplitude von 10 Oe und einer Mikrowellenstärke von 20.12 mW. Die Spektren wurden bei 11 K aufgenommen.

Die ESR Spektroskopie liefert einen weiteren Hinweis der Interaktion von Häm mit dem IscR Protein. Das zugegebene freie Hämin (Fe III) bindet an das IscR Protein. Hierbei wird da Hämin (Fe III) zu Häm (Fe II) durch den Austausch von Elektronen mit dem Protein reduziert und es entsteht das detektierte Tryptophan Radikal.

4.5.3 Die Spezifität der Hämbindung

Die Bindung von Häm an das IscR Protein aus *D. shibae* konnte durch ESR Spektroskopie nachgewiesen werden. Zur weiteren Charakterisierung wurde die spezifische Färbung von Häm genutzt. Hierbei wird die Peroxidaseaktivität der Häm Gruppe genutzt, die zur Oxidation von Chemilumineszenz aktiven Substraten führt. In diesem Versuch wurde das kommerziell erhältliche ECL Kit (GE Healthcare) verwendet, welches unter anderem den Stoff Luminol enthält. Das Luminol kann durch die Peroxidaseaktivität des Häms in zwei Schritten über ein Luminol-Radikal-Anion zu einem Luminolendoperoxid oxidiert werden wobei es letztlich zur Umwandlung des Luminols in Aminophthalate und zur Emission von Stickstoff und Licht kommt (Molitor *et al.*, 2013; Vargas *et al.*, 1993). Diese Lichtemission bzw. Chemilumineszenz kann anschließend detektiert werden. Banden würden nur an den Stellen detektiert werden, an denen das Häm frei oder in gebundener Form vorliegt. Um die spezifische Hämbindung an das IscR Protein näher zu untersuchen, wurde eine Auftrennung eines Häm-IscR Komplex über eine SDS PAGE durchgeführt.

Parallel dazu wurden Hämin und IscR Protein einzeln aufgetrennt. Als Kontrolle wurde das Protein Lysozym verwendet, an welches Häm unspezifisch bindet. Zur Abtrennung von ungebundenem Hämin wurde der Häm-IscR Komplex über eine Gelfiltrationssäule gereinigt. Bei einer unspezifischen Bindung wird hier das Häm vom Protein getrennt. Freies Hämin, anaerob gereinigtes IscR Protein, Häm/Protein Komplexe sowie freies Lysozym wurden auf zwei 15 %ige SDS PAGE aufgetrennt und ein Gel mit Instant-Blue™ gefärbt. Die Proteine des zweiten Gels wurden nach der SDS PAGE auf eine PVDF Membran transferiert. Auf der Membran wurde das Häm durch seine Peroxidasefunktion und die Oxidation des Luminols mit Hilfe des ECL Kits durch Detektion der Chemilumineszenz detektiert (Molitor *et al.*, 2013; Vargas *et al.*, 1993). Das StrepII-IscR Protein wird nach der Färbung im SDS Gel mit einer relative molekulare Masse von ca. 19 kDa in Spur 1, 3 und 4 nachgewiesen (Abb. 52 A, Spur 1, 3 und 4). Das Hämin wird durch InstantBlue™ nicht angefärbt (Abb. 52 A, Spur 2). Nach der Hämin Färbung kann nur das ungebundene Hämin nachgewiesen werden. Dabei wird es in der freien, ungebundenen Form als Bande auf Höhe der Lauffront detektiert (Abb. 52, Spur 2,3 und 4). Interessanterweise kann Hämin nach Inkubation mit IscR auch bei ca. 19 kDa, der relativen molaren Massen des IscR Proteins entsprechend, detektiert werden (Abb. 52, Spur 3). Dies deutet auf eine Bindung des Hämins an das IscR hin, die auch nach einer Gelfiltration erhalten bleibt (Abb. 52, Spur 4). Als Kontrolle für die unspezifische Bindung von Hämin an Proteine wurde das identische Experiment unter Verwendung von Lysozym durchgeführt. Hierzu wurden 40 µM Lysozym, eine 40 µM Hämin Lösung und ein Gemisch aus äquimolaren Mengen Lysozym und Hämin auf einer 15 % SDS PAGE aufgetrennt. Lysozym weist eine relative molare Masse von 14 kDa auf und ist deutlich als Bande im SDS Gel zu erkennen (Abb. 52 A, Spur 5, 7 und 8).

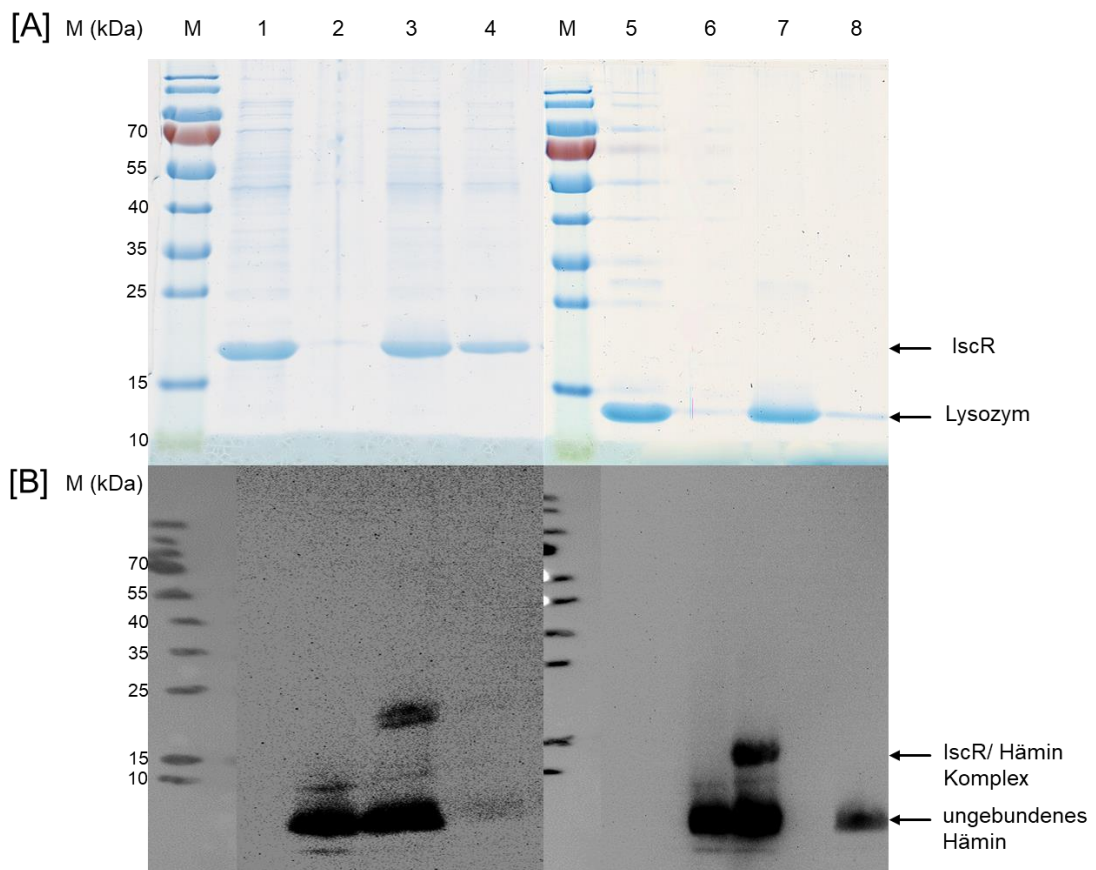


Abb. 52: Hämin Färbung von IscR aus *D. shibae* und Lysozym. A: 15 % SDS PAGE der Proben mit InstantBlue™ gefärbt. B: Die identischen Proben aus A wurden auf eine Membran transferiert und eine Hämin Färbung durchgeführt. Die Detektion des Hämins erfolgte unter Verwendung des ECL Kits. Spur M zeigt den Marker (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Das IscR Protein ohne Hämin wurde mit einer Konzentration von 40 μ M in einem Volumen von 10 μ l aufgetragen (Spur 1). Das Lysozym ohne Hämin wurde mit einer Konzentration von 40 μ M in einem Volumen von 10 μ l aufgetragen (Spur 5). 40 μ M freies Hämin (Spur 2 und 6), sowie eine IscR/Hämin Lösung (Spur 3) und eine Lysozym/Hämin Lösung (Spur 7) wurden aufgetragen. Zusätzlich wurde zur Abtrennung von ungebundenem Hämin eine Gelfiltration mit einer IscR/Hämin Probe (Spur 4) und einer Lysozym/Hämin Probe (Spur 8) durchgeführt. Die relative Molekulare Masse von IscR beträgt ca. 19 kDa und die von Lysozym ca. 14 kDa (Rennhack, TU Braunschweig, 2017).

Nach der Hämin Färbung ist Hämin als freies (Abb. 52 B, Spur 6 und 9) oder an Lysozym gebundenes Hämin zu detektieren (Abb. 52 B, Spur 7 obere Bande). Allerdings wird das Hämin durch die Gelfiltration abgetrennt und bindet nicht länger an das Lysozym. Es wird nur noch als freies Hämin detektiert (Abb. 52, Spur 8).

Das Hämin Bindungsexperiment gibt Hinweise darauf, dass Hämin im Gegensatz zu der unspezifischen Bindung an das Lysozym, spezifisch an das IscR Protein bindet.

Bei der Bindung von Hämin an das IscR Protein kann es sich entweder um eine kovalente oder eine nicht kovalente Bindung handeln. Bei einer nicht kovalenten Bindung von Hä-

min, liegt das Hämin in einer hydrophoben Tasche des Proteins vor. Dies kann zum Beispiel bei Hämoglobin beobachtet werden (Tam *et al.*, 2013). Bei einer Kovalenten Bindung wie sie zum Beispiel beim Cytochrom C stattfindet, ist die Häm Gruppe kovalent über Cysteinreste an das Protein gebunden (Deckwer *et al.*, 1999). Diese Form der Bindung ist deutlich stabiler als die nicht kovalente Bindung. Um die Bindung von Hämin an IscR weiter zu untersuchen, wurde eine Butanon Extraktion durchgeführt. Hierbei wird das Protein durch die Senkung des pH-Wertes denaturiert. Bei nicht kovalent gebundenem Häm kommt es zur Freisetzung des Hämins, welches nach Zugabe eines organischen Lösungsmittels wie Butanon in die organische Phase übergeht, während das Protein in der löslichen Phase verbleibt. Bei einer kovalenten Bindung des Hämins würde nach Zugabe des Butanons, das Häm zusammen mit dem Protein in der löslichen Phase verbleiben (Molitor *et al.*, 2013; TEALE, 1959).

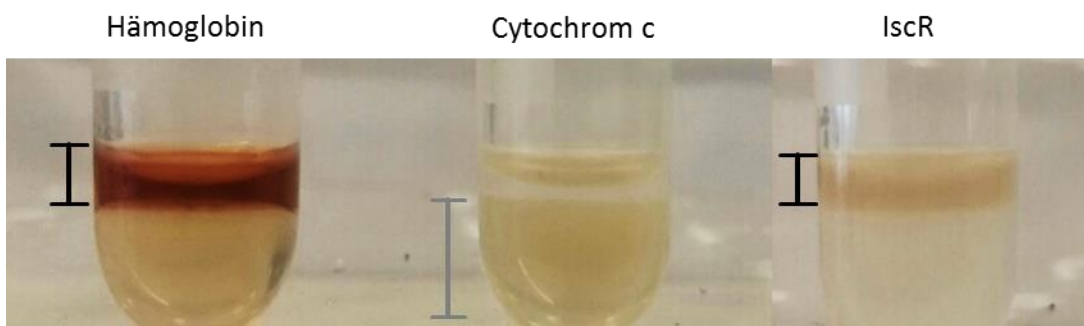


Abb. 53: Test der Hämin Bindung mittels Butanon Extraktion. Zu den Proteinproben Hämoglobin (60 μM), Cytochrom c (60 μM) sowie IscR (40 μM) nach Rekonstitution mit Hämin und anschließender Gelfiltration wurde bis zu einem pH-Wert von 1,5 bis 2 Salzsäure hinzu pipettiert. Nach der Zugabe von 2 Butanon wurden die Proben bis zur Phasentrennung auf Eis gelagert. Der schwarze Balken zeigt die organische Phase mit nicht kovalent gebundenem Hämin und der graue Balken die wässrige Phase mit kovalent gebundenem Hämin (Rennhack, TU Braunschweig, 2017).

Bei der Butanon Extraktion von IscR mit gebundenem Hämin wurde 30 μM anaerob gereinigtes StrepII-IscR Protein mit einem Überschuss von 60 μM Hämin für 5 Minuten inkubiert und anschließend über eine Gelfiltration von ungebundenem Hämin befreit. Der Protein-Häm Komplex wurde durch Zugabe von 1 M HCL bis zu einem pH-Wert von 1,5 bis 2 angesäuert und anschließend mit kaltem Butanon versetzt. Bis zu einer eindeutigen Phasentrennung wurden die Proben auf Eis gelagert. Zur Kontrollen wurde eine Hämoglobin Lösung und eine Cytochrom c Lösung ebenfalls wie oben beschrieben behandelt. In der Kontrolle mit Hämoglobin befand sich das Hämin nach der Butanon Extraktion in der oberen organischen Phase, während die Cytochrom c Kontrolle die Anwesenheit von Häm in der unteren wässrigen Phase zeigte (Abb. 53). Bei dem IscR Protein ist nach der Butanon Extraktion ebenfalls eine Phasentrennung zu beobachten, wobei das Hämin hier

in der oberen organischen Phase vorlag. Somit wurde gezeigt, dass Hämin nicht kovalent an das IscR Protein bindet. Eine schwächere Bindung und damit einhergehende schnellere Dissoziation des Häms ist von Vorteil, da es sich bei IscR um einen Transkriptionsregulator handelt, der schnell auf sich verändernde Eisenmengen durch Bindung von Häm reagieren muss.

4.5.4 Identifikation potentieller Liganden für die Häm Bindung

Bei der nicht kovalenten Bindung von Häm, bilden die Proteine oftmals eine hydrophobe Tasche aus in der das Häm über Wechselwirkungen der Aminosäurereste in der Tasche koordiniert wird. Die Sequenz von IscR aus *D. shibae* zeigt ein HRM Motiv mit dem charakteristischen Cystein und Prolin, welches im Vergleich mit anderen Alphaproteobakterien ebenfalls gefunden wurde (Abb. 49). Um den Einfluss dieses Motivs auf die Häm Bindung zu untersuchen, wurden mit Hilfe einer ortsgerichteten Mutagenese das *iscR* Gen so mutiert, dass das Cystein an Position 140 und das Prolin an Position 141 jeweils einzeln als auch zusammen gegen Alanine ausgetauscht wurden. Die Plasmide mit dem mutagenisierten *iscR* Gen wurden in *E. coli* B121CD+(DE3)-RIL Zellen transformiert, sodass die Produktionsstämme B121CD+(DE3)-RIL pET52*biscRC140A*, B121CD+(DE3)-RIL pET52*biscRP141A* und B121CD+(DE3)-RIL pET52*biscRC140A/P141A* entstanden. Analog zum IscR Wildtyp Protein wurden die Mutantenproteine heterolog produziert und anaerob gereinigt. Von den anaerob gereinigten IscR Mutantenproteine (10 µM) wurden im Anschluss UV/Vis Spektren aufgenommen. Es konnte keine Absorption im Bereich von 300-700 nm gemessen werden (Abb. 54). Zu den gereinigten Proteinen wurde Hämin in steigenden Mengen von 1 µM über 5 µM, 10 µM und 15 µM zu gegeben und UV/Vis Spektren aufgenommen (Abb. 54). Die freien Hämin Lösungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Die Hauptabsorption bei 385 nm ist auf das freie Hämin zurückzuführen. Nach der Zugabe von 5 µM Hämin zu je 10 µM der anaerob gereinigten IscR Mutantenproteinen IscR C140A, IscR P141A und IscR C140A/P141A, war eine Peakverschiebung zu 420 nm durch eine Absorptionsschulter sichtbar geworden (Abb. 54). Die Schulter bei 420 nm wurde mit zunehmenden Hämin Mengen für die Mutanten C140A und C140A/P141A stärker (Abb. 54). Die Zunahme der Schulter bei 420 nm deutet auf eine verbesserte Bindung des Hämins hin. Allerdings fehlen die zuvor beobachteten Absorptionen im Q-Bereich bei 540 nm bzw. 620 nm.

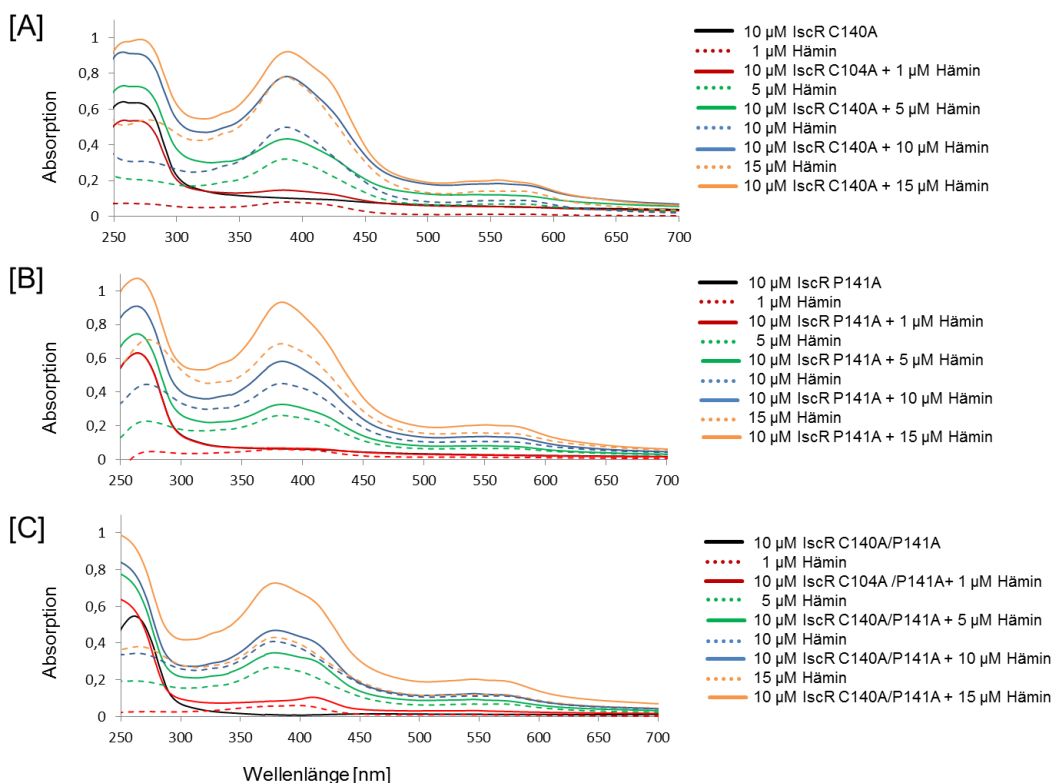


Abb. 54: UV/Vis Spektren der CP-Motiv Mutanten. Die IscR Mutanten C140A [A], P141A [B] und C140A/P141A [C] wurden in einem Wellenlängenbereich von 250 nm bis 700 nm spektroskopisch vermessen (UV/Vis V650 Spektrometer, JASCO). Es wurden jeweils 10 μM der Proteine ohne gebundenes Hämin (schwarze Kurve) und mit steigenden Mengen Hämin (durchgezogene Kurven) sowie entsprechende Mengen freien Hämins (gestrichelte Kurven) vermessen. Zu 10 μM IscR Protein wurde 1 μM Hämin (rote Kurve), 5 μM Hämin (grüne Kurve), äquimolare Mengen von Protein und Hämin (blaue Kurve) und 15 μM Hämin (orange Kurve) im Überschuss dazu gegeben (Rennhack, TU Braunschweig, 2017).

Bei einer spezifischen Bindung sollte in ESR Experimenten mit den IscR Mutantenproteinen das vorher beobachtete Signal für ein Tryptophan Radikal zu finden sein. Für die ESR Messungen wurden 60 μM des C140A, P141A und des C140A/P141A Proteins mit und ohne die Zugabe von 60 μM Hämin vermessen (Abb. 55). Die C140A Mutante zeigt ohne die Zugabe von Hämin kein spezifisches Signal im ESR (Abb. 55 A). Ein identischer Verlauf des ESR Spektrums ist auch für die P141A Mutante und die C140A/P141A Mutante zu beobachten (Abb. 55). Nach Zugabe von äquimolaren Mengen Hämin zeigen die Spektren von allen drei Mutanten ein Signal bei $g = 2,04$ (Abb. 55). Zur verbesserten Darstellung wurde ein Differenzspektrum für das Signal bei $g = 2,04$ erstellt durch das Subtrahieren der Hintergrundsignale (Abb. 55). Die Differenzspektren der drei gemessenen Mutanten nach der Zugabe von Hämin zeigen deutlich das Signal bei $g = 2,04$ für ein Tryptophan Radikal, das durch die spezifische Bindung von Hämin an das Protein entsteht.

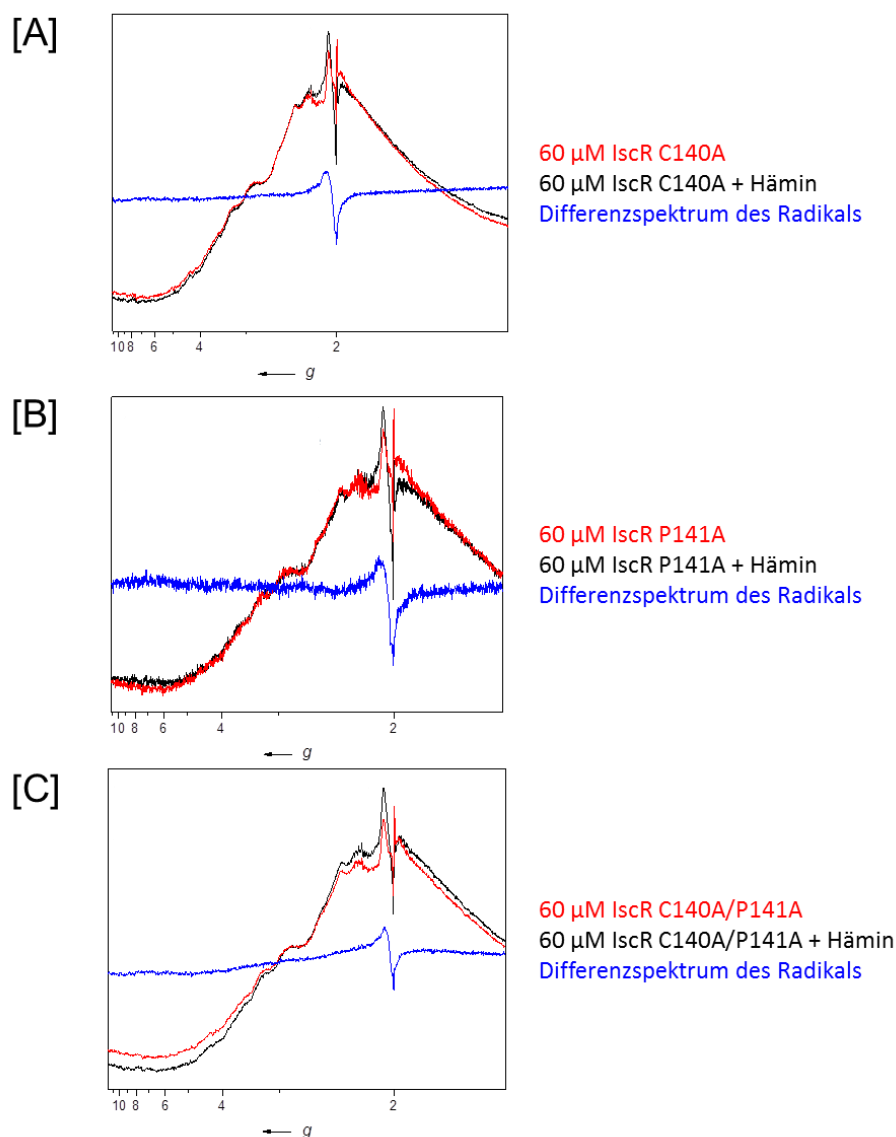


Abb. 55: ESR spektroskopische Analysen der CP Mutanten. Die Proteine C140A [A], P141A [B] sowie C140A/P141A [C] wurden mit einer Konzentration von 60 μM (rot) im ESR bei 9.4 GHz und 11 K vermessen. Nach der Zugabe äquimolarer Mengen Häm (schwarz) wurden erneut Messungen bei identischen Parametern aufgenommen und ein Differenzspektrum (blau) ermittelt. Die g-Werte sind angegeben (Rennhack, TU Braunschweig, 2017).

Das fehlende Signal für ein Tryptophan Radikal in den vermessenen IscR Mutantenproteinen C140A, P141A und des C140A/P141A, wäre ein Indiz für den Verlust der Bindungsfähigkeit von Häm gewesen. Da aber durch die eingeführten Mutationen weder eine verminderte Bindung von Häm an IscR in der UV/Vis Spektroskopie noch in den ESR Experimenten beobachtet wurde, scheint das CP Motiv nicht entscheidend für die Bindung zu sein. Es wurde ein Modell von *D. shibae* IscR nach der Kristallstruktur von *E. coli* IscR (PDB 4hf.1) modelliert. Ein Vergleich mit dieser Kristallstruktur zeigte, dass nur die Aminosäuren von 1-136 der *D. shibae* IscR Sequenz modelliert werden konnten.

Das interessante HRM Motiv mit dem Cystein und dem Prolin ist in *E. coli* IscR nicht enthalten.

In der Aminosäuresequenz des *E. coli* IscR ist außerdem nur ein Histidin an Position 107 zu finden, während das IscR Protein aus *D. shibae* drei Histidine an den Positionen 91, 119 und 125 aufweist. Für den Irr Regulator aus *B. japonicum* wurde gezeigt, dass die Häm Bindung über zwei Bindestellen stattfindet. Zum einen über das HRM Motiv mit einem Cystein und zum anderen über eine Bindestelle, mit drei benachbarten Histidinen (Yang *et al.*, 2005). Daher wäre es interessant in weiteren Analysen die Histidine des IscR aus *D. shibae* in Bezug auf die Häm Bindung näher zu untersuchen.

4.5.5 Heterologe Produktion des IscR Proteins mit einem zusätzlichen Hämin Aufnahmesystem

Im bisherigen Produktionsstamm *E. coli* BL21CD+(DE3)-RIL mit dem Plasmid pET52b-*iscR* konnte das StrepII-IscR Protein erfolgreich produziert werden. Bei der anschließenden Reinigung über eine Strep-Tactin Säule konnte jedoch nur die apo-Form des StrepII-IscR Proteins aufgereinigt werden. Es wurde kein gebundenes Häm detektiert. Anschließende Hämin Titrations und ESR Experimente zeigten, dass Hämin an das Protein binden kann. Um eine Bindung von Hämin bereits bei der Produktion *in vivo* zu verbessern wurde in den *E. coli* Produktionsstamm BL21CD+(DE3)RIL das Plasmid pHPEX3-Kan transformiert, das ein zusätzliches Hämin Aufnahmesystem trägt. Dieses zusätzliche Plasmid trägt ein Gen, das für den Häm Rezeptor ChuA codiert, der in der äußeren Membran lokalisiert ist und die Aufnahme von gelöstem Hämin aus dem Medium in die Zelle verbessert (Varnado & Goodwin, 2004). Die Plasmide pET52b-*iscR* und pHPEX3-Kan wurden Ko-transformiert in den *E. coli* Produktionsstamm BL21CD+(DE3)-RIL und das IscR Protein anschließend wie beschrieben heterolog produziert und anaerob gereinigt. Die Produktion und Reinigung des IscR Proteins erfolgte vergleichend mit und ohne Zugabe von Hämin ins Kulturmedium.

Die UV/Vis Spektroskopie des anaerob gereinigten StrepII-IscR Proteins, welches ohne eine zusätzliche Hämin Zugabe produziert wurde, zeigt wie das bisher gereinigte IscR Protein keine Absorption im Bereich von 350 nm bis 700 nm. Das UV/Vis Spektrum des gereinigten StrepII-IscR Proteins, welches mit zusätzlicher Häminzugabe ins Medium produziert worden ist, zeigt neben der typischen Absorption bei 280 nm für Proteine, noch

Absorptionen bei 370 nm, 420 nm, 528 nm und 556 nm (Abb. 56). Die leichte Schulter bei 370 nm ist auf freies, ungebundenes Hämin zurückzuführen und wurde bereits in den Hämin Titrationsexperimenten beobachtet. Die Bindung von Hämin an das Protein ist durch den Peak bei 420 nm und den schwachen Absorptionen bei 528 nm und 556 nm zu erkennen. Absorptionen bei ähnlichen Wellenlängen konnten bereits für Dehydrogenasen gezeigt werden, die ebenfalls in der Lage sind Häm mit einem Fe^{2+} Zentralatom zu binden (Hannibal *et al.*, 2012). Durch die Überproduktion eines zusätzlichen Hämin Aufnahmesystems durch den Vektor pHPEX3-Kan und der Zugabe von 5 mM in DMSO gelöstem Hämin ins Medium, konnte an das IscR Protein gebundene Häm Ko-gereinigt werden.

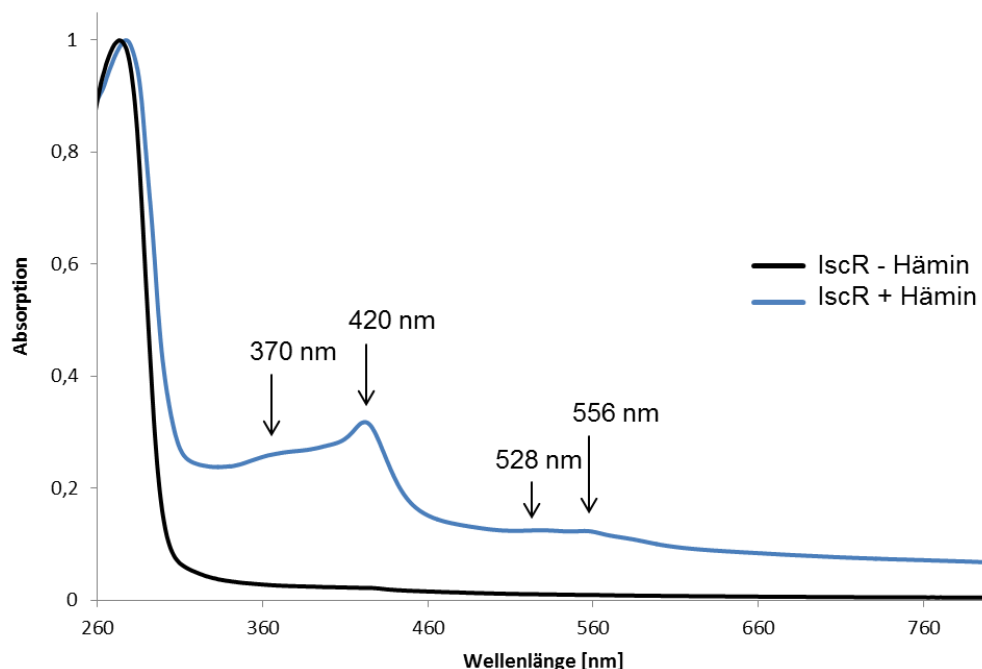


Abb. 56: Vergleich der UV/Vis Spektren von IscR mit und ohne Zugabe von Hämin zur Produktion. Das StrepII-IscR Protein mit zusätzlichem Hämin Aufnahmesystem wurde bei 25 °C mit der Zugabe von 5 mM Hämin (blaue Kurve) und ohne die Zugabe von 5 mM Hämin (schwarze Kurve) zum Medium produziert, anaerob gereinigt und spektroskopisch im UV/Vis vermessen. Die Hämin relevanten Absorptionsmaxima sind mit Pfeilen gekennzeichnet und die entsprechenden Wellenlängen angegeben (Kleiner, Braunschweig, unveröffentlichte Daten).

4.5.6 Bindungsstudien mittels Gelretardationsanalysen

Für den IscR Regulator aus *E. coli* konnte eine Autoregulation durch Bindung an den Promotorbereich des *iscR* Gens gezeigt werden. Dabei war die Bindung abhängig von der Koordination eines Fe-S Clusters (Schwartz *et al.*, 2001). Um eine ähnliche Autoregulation von IscR aus *D. shibae* durch Bindung an den eigenen Promotorbereich

zu untersuchen, wurden Gelretardationsstudien durchgeführt. Dafür wurde ein 195 bp langes Fragment des *iscR* Promotors von der Position -195 bis -1 im Bezug zum Translationsstart verwendet und mit Digoxigenin markiert. Dieser Bereich beinhaltet eine potentielle Bindestelle für den IscR Regulator mit dem Bindemotiv 5'-TGA-N₉-TCA-3', welches der Iron Rhodo Box (IRO) entspricht, die bioinformatisch aus Promotoren IscR-abhängig regulierter Gene aus Rhizobien abgeleitet wurde (Abb. 57) (Rodionov *et al.*, 2006).

```

GGATGCCTGTCCTCTCACCGCCGTTGCCGTTTGCCTCGTCTG
TTTTCTTGACGAATTCAATCGGGCAATCTAGAACCATTCTAA
ACCGAGCGTTGTGGAACCCGGCCCTGTGCAATTAATTAAGGA
AAGCAGGGGCGCAGGTCAATGTGCGGCGGCCGTTGCAGGGGA
GGGGATCGTG

```

Abb. 57: Promotorsequenz des *iscR* Gens. 178 bp langer Ausschnitt des *iscR* Promotors. Der Translationsstart ist blau hervorgehoben. Die potentielle IscR Bindestelle (gelb) ist markiert.

Ein leicht abgewandelte Sequenz der IRO-Box mit dem Motiv 5'-GA-N₉-TC-3' wurde in *R. sphaeroides* in IscR-abhängig regulierten Genen gefunden (Remes *et al.*, 2015). Das Sequenzmotiv der IRO-Box wurde auch in dem Promotorbereich des eisenabhängig regulierten *hemB2* Gens in *D. shibae* gefunden. Das *hemB2* Gen codiert für einen TonB abhängigen Häm/Hämoglobin Rezeptor. Bei diesem Gen handelt es sich um eines der am stärksten induzierten Gene unter Eisenmangel in *D. shibae*. Für die DNA Bindungsanalysen wurde das 155 bp lange DNA Fragment des *hemB2* Promotors gewählt, welches dem Promotorbereich von -155 bis -1 in Bezug zum Translationsstart entspricht (Abb. 39). In vorangegangenen Studien konnte bereits die Bindung des RirA Regulators mittels Footprint-und EMSA Analyse an diesen Promotorbereich gezeigt werden. Eine Bindung des IscR Regulators an den identischen Promotrbereich könnte für eine mögliche Ko-Regulation von RirA und IscR sprechen.

Neben der Bindung von IscR an den Promotorbereich seines eigenen Gens *iscR* und dem eisenabhängig regulierten Gens *hemB2* wurde auch die Rolle des Häm Kofaktors von IscR bei der Bindung an die DNA untersucht.

Daher wurde das IscR Protein für die DNA Bindungsstudien sowohl mit als auch ohne Häminzugabe produziert und anaerob gereinigt. Um die Bindung des anaerob gereinigten IscR Proteins an das mit Digoxigenin markierte 195 bp lange *iscR* Promotorfragment zu testen, wurden steigende Menge des IscR Proteins mit der DNA inkubiert.

Nach der Auftrennung der IscR-DNA Komplexe in einem nicht denaturierenden Polyacrylamid Gel, folgte ein Blot der DNA auf eine Nylonmembran. Die DIG-markierte DNA wurde durch Immunodetektion mit einem spezifischen Anti-DIG-Antikörper detektiert. Die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase setzt CDP Star als Substrat um, wodurch Chemilumineszenz freigesetzt wurde. Die entstehende Chemilumineszenz konnte im Anschluss detektiert werden.

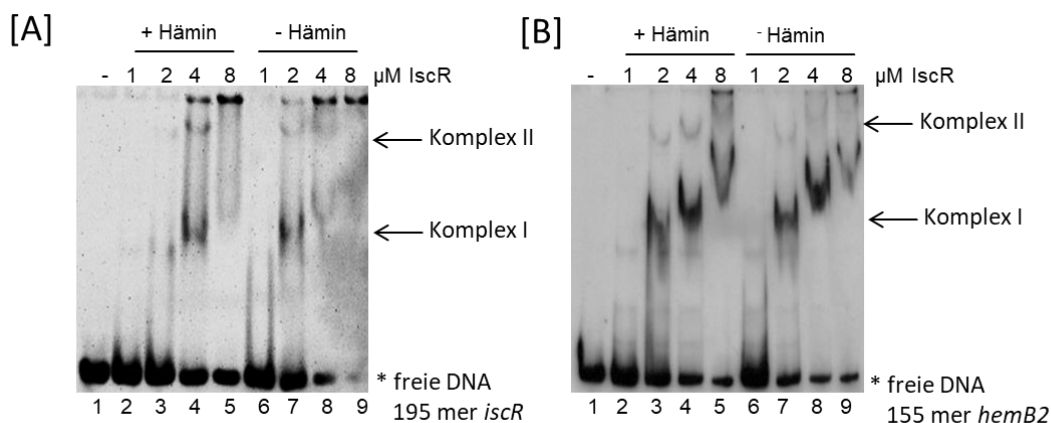


Abb. 58: Gelretardationsanalyse des anaerob gereinigten IscR Proteins mit und ohne gebundenem Häm mit dem DIG markiertem 195 bp langem Fragment des *iscR* Promotors und mit einem 155 bp langem Fragment des *hemB2* Promotors. A: Das DIG markierte 195 mer *iscR* Promotorfragment (0,2 pmol) wurde ohne Protein (Spur 1) und mit 1 µM (Spur 2+6), 2 µM (Spur 3+7), 4 µM (Spur 4+8) und 8 µM (Spur 5+9) anaerob gereinigtem IscR Protein mit Häm (Spur 2-5) sowie IscR Protein (Spur 6-9) inkubiert. B: Das DIG markierte 155 mer *hemB2* Promotorfragment (0,2 pmol) wurde ohne Protein (Spur 1) und mit 1 µM (Spur 2+6), 2 µM (Spur 3+7), 4 µM (Spur 4+8) und 8 µM (Spur 5+9) anaerob gereinigtem IscR Protein mit Häm Protein (Spur 2-5) sowie IscR Protein (Spur 6-9) inkubiert. Nach der Detektion sichtbare Protein/DNA Komplexe sind mit Pfeilen markiert. Die ungebundene DNA mit einem Stern (Kleiner, Braunschweig, unveröffentlichte Daten).

Durch die Bindung des IscR Proteins an die DNA entstehen Protein/DNA Komplexe, welche im Gel deutlich langsamer laufen als die freie DNA. Um die Laufhöhe der freien DNA von den Protein/DNA Komplexen zu unterscheiden, wurde als Kontrolle in einem Ansatz nur markierte DNA ohne Protein eingesetzt (Abb. 58, Spur 1). Die Bindungsfähigkeit von IscR mit Ko- aufgereinigtem Häm wurde durch die Zugabe von 1 µM, 2 µM, 4 µM und 8 µM Protein untersucht (Abb. 58, Spur 2-5). Nach der Zugabe von 1 µM IscR Protein ist eine leichte Bande zu erkennen (Komplex I) (Abb. 58, Spur 2). Mit steigenden Proteinmengen von 2 µM und 4 µM nimmt die Stärke dieser Bande zu. Zusätzlich entsteht eine leichte Verschiebung der Bande nach oben und es war ein weiterer Komplex, der deutlich höher läuft als der Komplex I, zu beobachten (Abb. 58, Spur 2-4). Diese Bande steht für einen höhermolekularen Komplex II. Die Banden für die Komplexe I und II werden deutlich stärker nach der Zugabe von 4 µM IscR Protein mit Ko-aufgereinigtem

Häm und gleichzeitig ist eine Abnahme der freien DNA zu beobachten (Abb. 58, Spur 4). Zusätzlich bleibt ein großer Teil der Probe in der Tasche hängen und wird nicht aufgetrennt. Dies ist auch nach der Zugabe von 8 μM Protein zu beobachten, was in einer Abnahme der Banden für den Protein/DNA Komplex I und Komplex II resultiert (Abb. 58, Spur 5). Die Bildung der IscR/DNA Komplexe I und II weisen auf eine spezifische Bindung des mit Häm Ko-aufgereinigten IscR Proteins an seinen eigenen Promotorbereich hin. Um den Einfluss des Häm Kofaktors zu untersuchen, wurde das Experiment mit IscR Protein wiederholt, welches in der Abwesenheit von Hämin produziert worden ist (Abb. 58, Spur 6-9). Mit steigenden Mengen an IscR Protein konnte auch hier die Bildung von zwei IscR/DNA Komplexen beobachtet werden (Abb. 58, Spur 6-8). Eine weitere Steigerung der Proteinmenge auf 8 μM IscR führt zu einer Aggregation, die nicht aufgetrennt werden kann und daher bleiben die Proben in der Tasche hängen (Abb. 58, Spur 9).

Die Ergebnisse der EMSA Analysen zeigten, dass der IscR Regulator an seinen eigenen Promotorbereich binden kann. Eine Abhängigkeit der Bindung von der Anwesenheit von Hämin konnte nicht gefunden werden. Dabei ist nicht klar, ob das IscR Protein Hämin in ausreichender Menge gebunden hat. Weiterführende Versuche mit der Zugabe von Hämin in den Bindungsansatz könnten hierzu durchgeführt werden. Darüber hinaus war für das IscR Protein von *E. coli* gezeigt worden, dass es in der Lage ist auch ohne Fe-S Kofaktor an die DNA zu binden (Rajagopalan *et al.*, 2013).

Nach dem die Bindung von IscR an seinen eigenen Promotorbereich unabhängig vom Häm Kofaktor gezeigt werden konnte, wurde die Bindung von IscR an ein *hemB2* Promotorfragment untersucht.

Als Kontrolle wurde in einem Ansatz nur markierte DNA ohne Protein eingesetzt, um die Laufhöhe der freien DNA von den Protein/DNA Komplexen zu unterscheiden (Abb. 58 B, Spur 1). Nach der Zugabe von 1 μM IscR Protein, welches in der Anwesenheit von Hämin produziert worden ist, zum *hemB2* Promotorfragment entstand ein Komplex, der auf eine Interaktion des Proteins mit der DNA hinweist (Abb. 58 B, Spur 2). Durch eine Verdopplung der Protein Menge auf 2 μM entstehen zwei Protein/DNA Komplexe, die sich im Laufverhalten stark unterscheiden (Abb. 58 B, Spur 3). Nach der Zugabe von 4 μM und 8 μM IscR Protein, welches in der Anwesenheit von Hämin produziert worden ist, kam es zu einer Verstärkung der Banden der Komplexe I und II, und einer Abnahme der Menge an freier DNA (Abb. 58 B, Spur 4 und 5). Allerdings verändert sich das

Laufverhalten des Komplex I. Mit zunehmender Proteinmenge wandert der Komplex langsamer im Gel, was durch die kürzere Laufstrecke sichtbar wurde. Ein vergleichbares Bandenmuster zeigte sich auch nach der Zugabe von IscR Protein in Mengen von 1-8 μM , welches in der Anwesenheit von Häm produziert worden war (Abb. 58 B, Spur 6-9). Nach der Zugabe von 1 μM Protein kommt es erneut zur Bildung eines Komplex I durch Interaktion des Proteins mit der DNA (Abb. 58 B, Spur 6). Erneut entstehen erst nach der Zugabe von 2 μM Protein die Komplexe I und II (Abb. 58 B, Spur 7). Nach Zugabe von 4 μM und 8 μM Protein wurden die Banden für die Komplexe I und II deutlich stärker und die Bande für die freie DNA nahm ab (Abb. 58 B, Spur 8 und 9). Ähnlich wie in den Bindungsanalysen mit dem *iscR* Promotorfragment konnte auch hier kein Einfluss von Häm auf die Bindungsfähigkeit des Proteins an die DNA beobachtet werden.

Ein Vergleich der Bindung des gereinigten IscR Proteins an den *hemB2* Promotor mit dem gereinigten RirA Protein zeigt, dass die Banden die durch die Bindung von RirA an die DNA entstehen definierter sind und immer auf der identischen Höhe laufen. Bei der Bindung von IscR an die DNA des *hemB2* Promotors verändert sich das Laufverhalten der Protein/DNA Komplexe und es sind neben einigen kleineren Komplexen auch keine scharfen Banden zu erkennen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Bindung von IscR an den Promotorbereich von *hemB2* nicht so spezifisch ist wie die Bindung von RirA. Dieses Bindungsverhalten könnte auch Einfluss auf die Regulation des Gens haben.

4.6 Rolle der identifizierten RirA und IscR Regulatoren für die Adaptation an Eisenmangel

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle der Regulatoren RirA und IscR für die Aufnahme von Eisen aus der Umwelt und die Regulationsmechanismen zur Anpassung an Eisenlimitierungen untersucht werden. Daher wurde das *rirA* Gen sowie das *iscR* Gen durch gezielte Mutagenese inaktiviert (Abb. 59). Für die Deletion von des *rirA* Gens (*Dshi_1660*) wurden 1289 bp stromaufwärts und 1813 bp stromabwärts amplifiziert und in den suicide Vektor pEX18Tc kloniert (Hoang *et al.*, 1998). Anschließend wurden 872 bp des Vektors pBBR1-MCS-5, welche dem Bereich der Gentamicin Resistenzkassette entsprechen, mittels PCR amplifiziert und zwischen die flankierenden Bereiche des *rirA* Gens kloniert (Kovach *et al.*, 1995). Das so entstandene Plasmid wurde mit pEX18Tc Δ *rirA* bezeichnet.

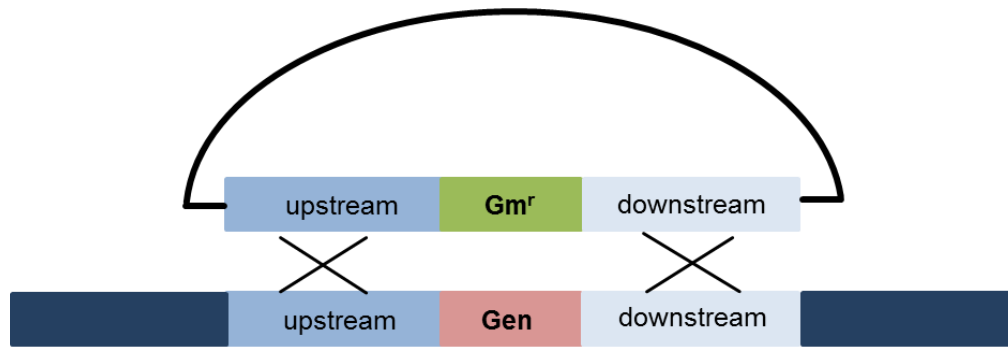


Abb. 59: Schematische Darstellung der homologen Rekombination. Upstream Bereiche sind blau markiert, downstream Bereiche hellblau. Die Gentamicin Resistenzkassette ist grün gekennzeichnet (Gm^r) und das zu deletierende Gen rot.

Das Plasmid wurde in den *E. coli* ST18 Donorstamm transformiert und anschließend durch biparentale Konjugation in den *D. shibae* DFL12^T Wildtypstamm transferiert (Thoma & Schobert, 2009). Die anschließende Selektion potentieller Klone erfolgte aufgrund der inserierten Antibiotikaresistenz gegen Gentamicin. Eine Deletion erfolgt, wenn über beide flankierende Bereiche eine homologe Rekombination stattfindet. Dann wird das *rirA* Gen durch die Gentamicin Resistenzkassette ersetzt. Findet die homologe Rekombination nur an einem der flankierenden Bereiche statt, wird das gesamte Plasmid integriert. Zur Kontrolle der homologen Rekombination, wurde eine Multiplex PCR durchgeführt, die zum einen die Gentamicin Kassette nachweist und zum anderen das eventuell noch vorhandene *rirA* Gen. Für die Δ *rirA* Deletionsmutante wurden ca. 80 Gentamicin resistente Klone per Multiplex PCR kontrolliert. Drei Klone wiesen in der Multiplex PCR nur die Bande für die Gentamicin Kassette auf (Abb. 60 A). Das *rirA* Gen war nicht nachzuweisen (Abb. 60 A). Hierbei handelt es sich um positive Klone, bei denen das *rirA* Gen erfolgreich deletiert und durch eine Gentamicin Resistenzkassette ersetzt werden konnte. Der Δ *rirA* Mutantenstamm wurde mit DS010 bezeichnet. Alle anderen Klone trugen zwar die Gentamicin Resistenzkassette, jedoch war auch noch das *rirA* Gen nachzuweisen. Hier hat nur ein einzelnes Crossover stattgefunden, wodurch das gesamte Plasmid in das Genom integriert wurde.

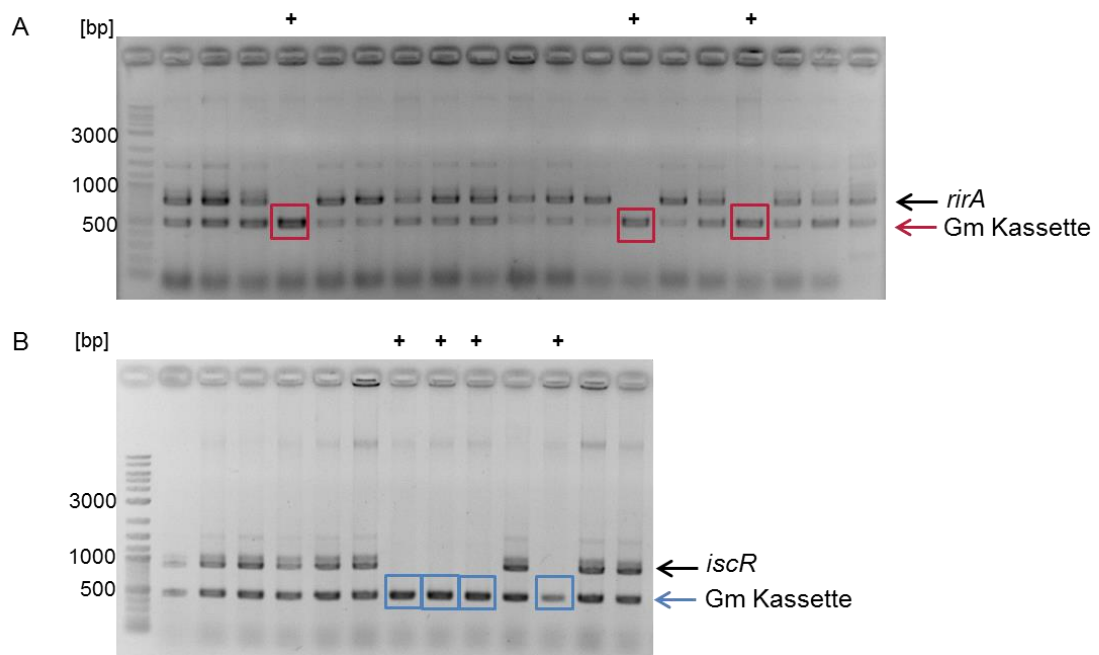


Abb. 60: Agarosegele der Multiplex PCR für *rirA* und *iscR* Deletionsmutanten. Unter Verwendung einer Multiplex PCR konnte der Einbau der Gentamicin Resistenzkassette zur Erstellung von Deletionsmutanten in *D. shibae* getestet werden. A: Banden auf der Höhe von 762 bp zeigen den Verbleib des *rirA* Gens im Genom an und sind durch einen schwarzen Pfeil markiert. Banden auf Höhe von 490 bp zeigen den Einbau der Gentamicin Kassette und sind durch einen roten Pfeil markiert. Positive Deletionsmutanten weisen nur die Gentamicin Resistenzkassette auf und sind mit einem roten Kasten markiert und mit einem + gekennzeichnet. B: Banden auf der Höhe von 912 bp zeigen den Verbleib des *iscR* Gens im Genom an und sind durch einen schwarzen Pfeil markiert. Banden auf Höhe von 486 bp zeigen den Einbau der Gentamicin Kassette und sind durch einen blauen Pfeil markiert. Positive Deletionsmutanten weisen nur die Gentamicin Resistenzkassette auf und sind mit einem blauen Kasten markiert und mit einem + gekennzeichnet. Als Marker wurde der Quick-Load Purple 2-Log DNA Ladder (NEB) verwendet

Analog wurde auch eine Deletion des *iscR* Gens durchgeführt. Für die Deletion von des *iscR* Gens (*Dshi_1633*) wurden 1133 bp stromaufwärts und 1094 bp stromabwärts amplifiziert und in den suicide Vektor pEX18Tc kloniert (Hoang *et al.*, 1998). Anschließend wurden 861 bp des Vektors pBBR1-MCS-5, welche dem Bereich der Gentamicin Resistenzkassette entsprechen, mittels PCR amplifiziert und zwischen die flankierenden Bereiche des *iscR* Gens kloniert (Kovach *et al.*, 1995). Das so entstandene Plasmid wurde mit pEX18TcΔ*iscR* bezeichnet.

Von 150 getesteten Gentamicin resistenten Klonen wiesen vier nur die inserierte Gentamicin Resistenzkassette und kein *iscR* Gen mehr auf (Abb. 60 B). Der Δ*iscR* Mutantent Stamm wurde mit DS011 bezeichnet

Gemeinsam mit den Transposonmutanten für das *fur* Gen sowie das *irr* Gen wurden der *ArirA* und der *DiscR* Mutantenstamm auf ihr Wachstumsverhalten in der An- und Abwesenheit von 15 μM FeSO_4 untersucht, um die Rolle dieser vier eisenabhängigen Regulatoren für die Adaptation an Eisenmangelbedingungen zu untersuchen (Abb. 61).

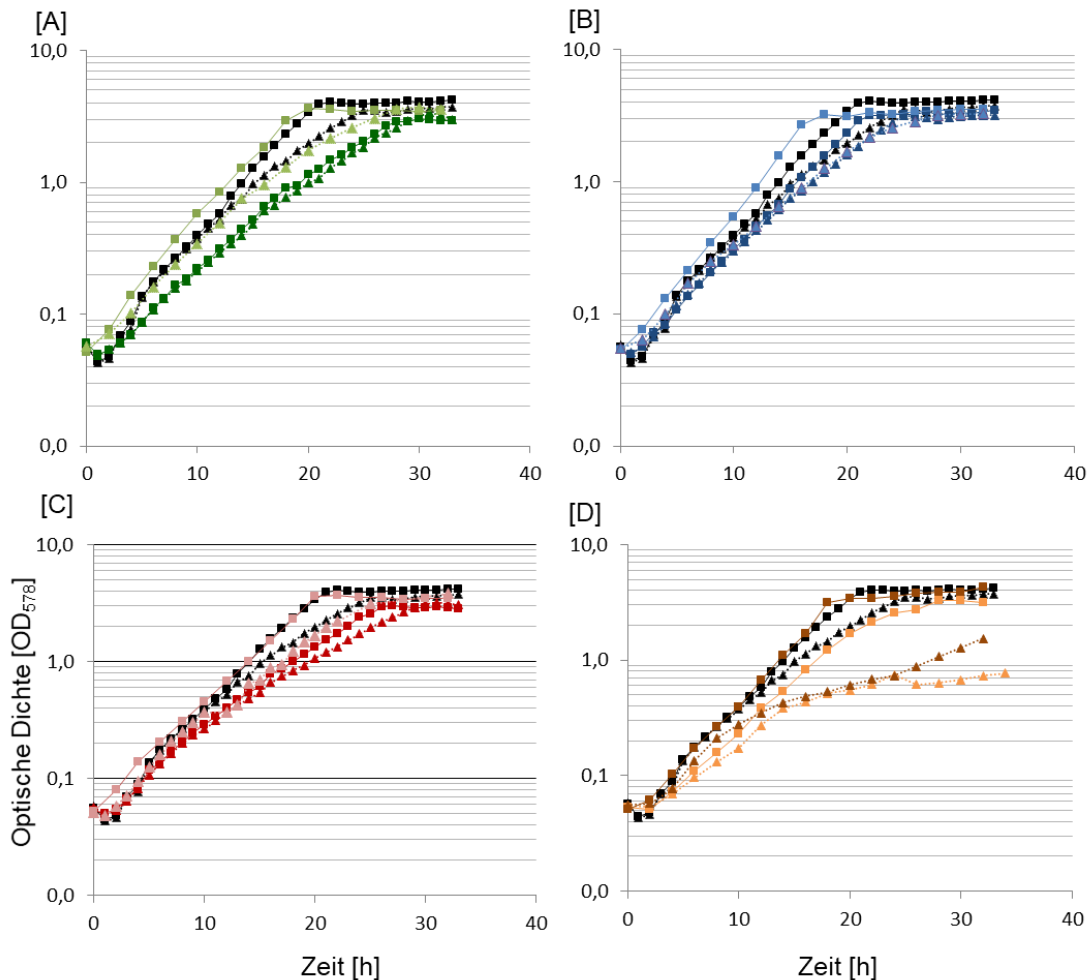


Abb. 61: Wachstumskurven des DFL12^T Wildtypstamms, den Mutanten Δfur , Δirr , $\Delta rirA$, $\Delta iscR$ sowie den entsprechenden Komplementanten. Die jeweiligen Stämme wurden mit einer Start OD₅₇₈ von 0,05 in SWM Medium mit 15 μM FeSO_4 (+Fe, durchgezogene Linien, viereckige Datenpunkte) und ohne die Zugabe von Eisen (-Fe, gestrichelte Linien, dreieckige Datenpunkte) angeimpft. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von 34 h durch photometrische Bestimmung der OD₅₇₈ bestimmt. A: Wachstumskurven des *D. shibae* DFL12^T Stamms (schwarz) im Vergleich zur Δfur Mutante (dunkel grün) und der $\Delta fur::fur$ Komplementante (hellgrün). B: Wachstumskurven des *D. shibae* DFL12^T Stamms (schwarz) im Vergleich zur Δirr Mutante (dunkel blau) und der $\Delta irr::irr$ Komplementante (hellblau). C: Wachstumskurven des *D. shibae* DFL12^T Stamms (schwarz) im Vergleich zur $\Delta rirA$ Mutante (dunkel rot) und der $\Delta rirA::rirA$ Komplementante (hellrot). D: Wachstumskurven des *D. shibae* DFL12^T Stamms (schwarz) im Vergleich zur $\Delta iscR$ Mutante (braun) und der $\Delta iscR::iscR$ Komplementante (orange).

Der *D. shibae* DFL12^T Wildtypstamm zeigt eine Latenz-Phase von 2-3 Stunden, in der sich die Bakterien an das Medium mit und ohne Eisenzugabe adaptieren und gehen dann in eine logarithmische Wachstumsphase über (Abb. 61, schwarze Kurve). Aufgrund der

geringeren Steigung in der exponentiellen Wachstumsphase war erkennbar, dass der *D. shibae* Wildtypstamm ohne Eisen ein verringertes Wachstum im Vergleich zur Kultur mit Eisen aufweist. Nach ca. 22 h geht der Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen in die stationäre Phase über. Zu diesem Zeitpunkt wies die Kultur eine OD₅₇₈ von ca. 4,5 auf. Die Wachstumsrate μ (*h⁻¹) für den *D. shibae* Wildtyp in Anwesenheit von 15 μ M Eisen beträgt 0,1. In Abwesenheit von Eisen geht der Wildtypstamm erst nach ca. 27 h in die stationäre Phase über, erreicht nur eine OD₅₇₈ von ca. 3,7 und hat eine Wachstumsrate μ (*h⁻¹) von 0,075.

Ein Vergleich des Wachstums des *Δfur* Mutantenstamms mit dem *D. shibae* Wildtypstamm zeigt, dass durch die geringere Steigung in der exponentiellen Wachstumsphase ein langsames Wachstum in dem *Δfur* Mutantenstamm stattfindet (Abb. 61, A). Dabei war nur ein geringer Unterschied zwischen Anwesenheit und Abwesenheit von Eisen zu beobachten. Die *Δfur* Mutante erreicht erst nach ca. 30 h die stationäre Wachstumsphase mit einer maximalen OD₅₇₈ von 3,0 und einer Wachstumsraten μ (*h⁻¹) von 0,08.

Der *Δirr* Mutantenstamm zeigt ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Wildtypstamm, mit einer Wachstumsrate μ (*h⁻¹) von 0,095 in Anwesenheit von Eisen und 0,07 in Abwesenheit von Eisen (Abb. 61, B).

Ein Vergleich des Wachstums des *ΔrirA* Mutantenstamms mit dem *D. shibae* Wildtypstamm zeigte, durch eine deutlich geringere Steigung in der exponentiellen Wachstumsphase ein langsames Wachstum des *ΔrirA* Mutantenstamms (Abb. 61, C). In Anwesenheit von Eisen erreicht der *ΔrirA* Mutantenstamm erst nach ca. 28 h die stationäre Wachstumsphase mit einer OD₅₇₈ von ca. 2,9 und einer Wachstumsrate μ (*h⁻¹) von 0,075. In Abwesenheit von Eisen wächst der *ΔrirA* Mutantenstamm mit einer Wachstumsrate μ (*h⁻¹) von 0,065 ebenfalls deutlich schlechter als der *D. shibae* Wildtypstamm unter diesen Bedingungen und erreicht erst nach ca. 31 h die stationäre Wachstumsphase mit einer maximalen OD₅₇₈ von ca. 3,0.

Der *ΔiscR* Mutantenstamm zeigte, verglichen mit dem *D. shibae* Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen, ein leicht verlangsamtes Wachstum mit einer Wachstumsrate μ (*h⁻¹) von 0,095 auf (Abb. 61, D). Ein deutlich stärkeres Wachstumsdefizit ist in Abwesenheit von Eisen in der *ΔiscR* Mutante zu beobachten. Die *ΔiscR* Mutante erreicht nur eine maximale OD₅₇₈ von 0,7 mit einer Wachstumsrate μ (*h⁻¹) von 0,035.

Die Wachstumsexperimente mit dem *D. shibae* Wildtypstamm zeigen, dass unter Eisenmangel ein verlangsamtes Wachstum in der Bakterienkultur stattfindet. Die Deletion des

Fur Regulators zeigt zwar ein leicht vermindertes Wachstum in dem entsprechenden Mutantenstamm, allerdings ist dieses verminderte Wachstum unabhängig von der Verfügbarkeit von Eisen zu beobachten. Somit scheint der Fur Regulator zwar wichtig für das Wachstum von *D. shibae* zu sein, allerdings ist kein Einfluss auf die Eisenaufnahme zu erwarten. Dies ist überraschend, da Fur in vielen Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* aber auch in einigen Gram-positiven Bakterien wie *B. subtilis* als der Hauptregulator der Eisenaufnahme fungiert (Braun, 2003; Ollinger *et al.*, 2006). Eine Mutation des Irr Regulators zeigt nahezu keinen Einfluss auf das Wachstum von *D. shibae* und somit auch keinen direkten Einfluss von Irr für die Adaptation an Eisenmangel. Im Gegensatz zum Fur und Irr Regulator zeigte eine Deletion des *rirA* Gens einen stärkeren Einfluss auf das Wachstum von *D. shibae* in An- und Abwesenheit von Eisen. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass RirA an der Regulation der Eisenaufnahme beteiligt ist. Weitaus wichtiger scheint aber der IscR Regulator für die Anpassung an Eisenmangel zu sein, denn in dem *ΔiscR* Mutantenstamm war in Abwesenheit von Eisen das stärkste Wachstumsdefizit zu beobachten. Wahrscheinlich wird unter Eisenmangel der IscR Regulator für Adaptation an Eisenmangel benötigt.

Um zu zeigen, dass die beobachteten Wachstumsphänotypen durch die Deletion der Regulatorgene entstanden waren, wurden Komplementationsexperimente für die Mutantenstämme *Δfur*, *Δirr*, *ΔrirA* und *ΔiscR* durchgeführt. Bei der Komplementation wurden intakte Regulatorgene durch ein Plasmid in den Mutantenstamm eingebracht und expriert. Hierbei kann entweder der eigene Promoter des Gens verwendet werden, oder aber ein konstitutiver Promoter. Für die Komplementation von *Δfur*, *Δirr*, *ΔrirA* und *ΔiscR* wurde das Plasmid pRhokS verwendet, in dem die Regulatorgene unter die Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors des *aphII* Gens gestellt wurden (Katzke *et al.*, 2010). Die Gene *fur*, *irr*, *rirA* und *iscR* wurden per PCR amplifiziert und hinter den konstitutiven Promotor kloniert. So entstanden die Plasmide pRhokS*fur*, pRhokS*irr*, pRhokS*rirA* und pRhokS*iscR*. Durch biparentale Konjugation wurden die Plasmide in die jeweiligen Mutantenstämme eingebracht, auf Chloramphenicol Resistenz selektioniert und per PCR kontrolliert. Positive Klone wurden für anschließende Wachstumsexperimente verwendet. Die Komplementation von *Δfur::fur* (Abb. 61 A), *Δirr::irr* (Abb. 61 B), *ΔrirA::rirA* (Abb. 61 C) und *ΔiscR::iscR* (Abb. 61 D) wurde sowohl mit dem Wildtypstamm als auch mit den jeweiligen Mutanten verglichen.

Die Komplementation der Δfur Mutante war erfolgreich, da der komplementierte Δfur Mutantenstamm mit Wachstumsraten μ (h^{-1}) von 0,1 in Anwesenheit und 0,065 in Abwesenheit von Eisen wie der Wildtypstamm wuchs. Ein nahezu identisches Wachstumsverhalten zeigt auch die Komplementante des Δirr Mutantenstamms mit Wachstumsraten μ (h^{-1}) von 0,1 in Anwesenheit von Eisen und 0,075 in Abwesenheit von Eisen. Ebenfalls erfolgreich war die Komplementation der $\Delta rirA$ Mutante mit Wachstumsraten μ (h^{-1}) von 0,095 in eisenhaltigem Medium und 0,07 unter Eisenmangel. Somit war die Komplementation der Transposonmutanten Δfur und Δirr sowie der Deletionsmutante $\Delta rirA$ durch Einbringen eines Plasmids mit einem konstitutiven Promotor erfolgreich. Die Komplementation der $\Delta iscR$ Mutante war nur teilweise möglich. In der Anwesenheit von Eisen erreicht die Komplementante $\Delta iscR::iscR$ eine Wachstumsrate μ (h^{-1}) von 0,1 und entspricht somit dem Wildtypstamm. Allerdings zeigte die Komplementante der $\Delta iscR$ Mutante nach wie vor ein stark verlangsamtes Wachstum in der Abwesenheit von Eisen im Vergleich zum Wildtypstamm. Unter Eisenmangel erreicht die Komplementante von $\Delta iscR$ nur eine finale OD_{578} von 1,5 mit einer Wachstumsrate μ (h^{-1}) von 0,055. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Expression des *iscR* Gens in einem Operon liefern. Das *iscR* Gen ist das erste Gen einer Operonstruktur, mit 11 Genen, die für Proteine der Fe-S Cluster Biogenese codieren (Abb. 62).



Abb. 62: Schematische Darstellung der Operonstruktur des SUF Genclusters in *D. shibae*.

Die Deletion des *iscR* Gens könnte dazu führen, dass die nachfolgenden Gene des Operons nicht exprimiert werden. In der Folge kann es zu einer geringeren Effizienz in der Biogenese von Fe-S Clustern kommen. Da Fe-S Cluster wichtige Komponenten der Atmungskette und in vielen Proteinen und Enzymen als Kofaktoren gebunden sind, kann es zu einem verringerten Wachstum kommen. Eine Komplementation mit dem *iscR* Gen führt dann nicht zu einer Komplementation des Wachstumsphänotyps.

In einem weiteren Versuch wurde die Expressionsstärke ausgehend vom *aphII* Promotor mit der des nativen *rirA* Promotors untersucht. Hierzu wurde das *rirA* Gen hinter den konstitutiven Promoter *aphII* mit einem N-terminalen StrepII-Tag oder mit seinem eigenen Promoter mit einem C-terminal fusionierten StrepII-Tag kloniert (Abb. 63). Beide

Konstrukte wurden in den pRhokS Vektor kloniert und die Plasmide mit *pRhokS aphII* StrepII-*rirA* und pRhokS *rirA*-StrepII. bezeichnet (Katzke *et al.*, 2010). Nach einem konjugalen Transfer in den *D. shibae* Δ *rirA* Mutantenstamm und Selektion auf Chloramphenicol, wurden resistente Klone durch eine PCR kontrolliert, ob das *rirA* Gen wieder in den Stämmen vorhanden war.

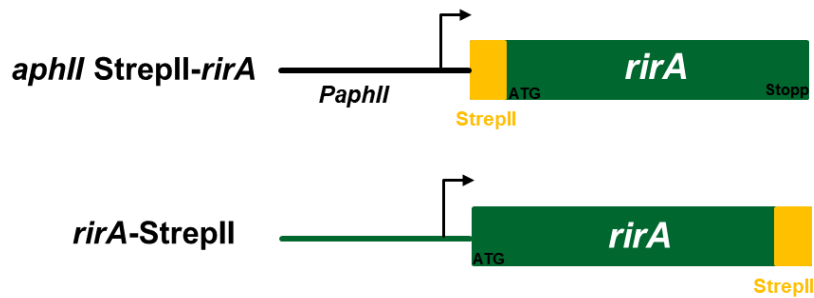


Abb. 63: Fragmente für die Komplementation von Δ *rirA* mit eigenem oder konstitutivem Promoter. Das *aphII* Strep-*rirA* weist den konstitutiven *aphII* Promoter auf und das *rirA* Gen wurde N-terminal mit einem StrepII-Tag fusioniert (DS191). Beim Fragment *rirA*-Strep wurde der eigene Promoter verwendet und das *rirA* Gen C-terminal mit einem StrepII-Tag fusioniert (DS192). Potentielle Transkriptionsstartpunkte sind durch Pfeile markiert, vorhandene Start- und Stopp-Codons sind angegeben und der fusionierte StrepII-Tag gelb markiert.

Die komplementierten Mutantenstämme (DS191 und DS192) wurde über einen Zeitraum von 40 h auf ihr Wachstum hin untersucht und mit der Δ *rirA* Mutante bzw. dem DFL12^T Wildtypstamm verglichen. Die Komplementation war mit beiden Konstrukten erfolgreich. Die Komplementante mit dem konstitutiven *aphII* Promoter zeigt ein deutlich besseres Wachstum als der Δ *rirA* Mutantenstamm sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit von Eisen (Abb. 64). Das Wachstum ist nahezu identisch mit dem Wildtypstamm (Abb. 64 A). Die Komplementante mit dem nativen Promotor wächst ebenfalls deutlich besser als der Δ *rirA* Mutantenstamm, erreicht allerdings erst in der späteren stationären Wachstumsphase die optische Dichte des Wildtypstamms (Abb. 64 B).

Um die Menge an produziertem RirA Protein mit N-bzw. C-terminal fusionierten StrepII-Tag zu detektieren, wurden in der exponentiellen Wachstumsphase nach 12 h und zu Beginn der Stationären Phase nach 20 h Proben genommen. Die Proteine wurden anschließend auf einer SDS PAGE aufgetrennt und eine Westernblotanalyse durchgeführt.

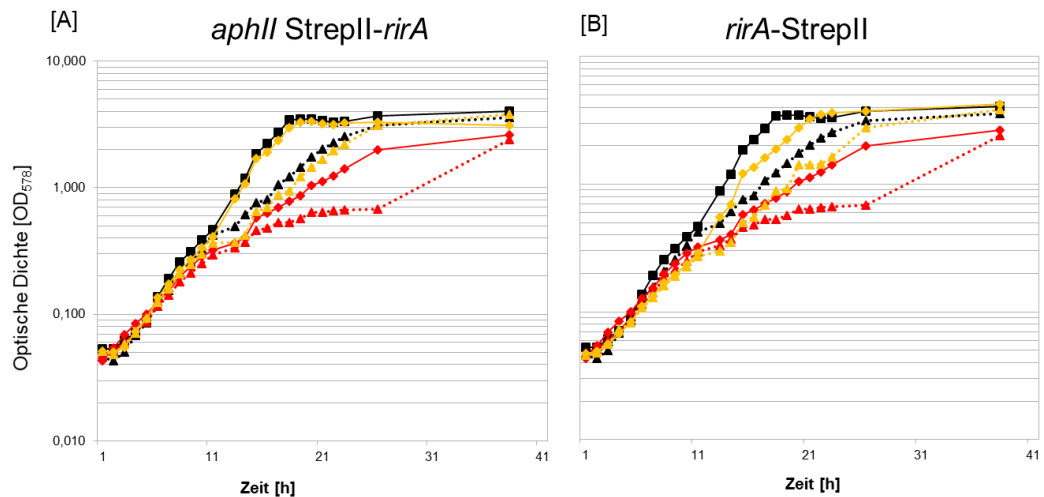


Abb. 64: Wachstumskurven der Komplementanten von $\Delta rirA$ im Vergleich zur $\Delta rirA$ Deletionsmutante und dem DFL12^T Wildtyp. Die jeweiligen Stämme wurden mit einer Start OD₅₇₈ von 0,05 in SWM Medium mit 15 μM FeSO₄ (+Fe, durchgezogene Linien, viereckige Datenpunkte) und ohne die Zugabe von Eisen (-Fe, gestrichelte Linien, dreieckige Datenpunkte) angeimpft. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von 40 h durch photometrische Messung der OD₅₇₈ bestimmt. A: Wachstumskurven des *D. shibae* DFL12^T Stamms (schwarz) im Vergleich zur $\Delta rirA$ Mutante (dunkel rot) und der Komplementante mit dem konstitutiven *aphII* Promotor und N-terminal fusioniertem StrepII-Tag (gelb). B: Wachstumskurven des *D. shibae* DFL12^T Stamms (schwarz) im Vergleich zur $\Delta rirA$ Mutante (dunkel rot) und der Komplementante mit endogenem Promotor und einem C-terminal fusioniertem StrepII-Tag (gelb).

In allen Proben konnte mit einem spezifischen Anti-Strep Antikörper ein Protein mit der relativen molekularen Masse von ca. 18 kDa detektiert werden. Dies entspricht der erwarteten Größe des produzierten StrepII-RirA Fusionsproteins (Abb. 65). Darüber hinaus zusätzlich auftretenden Banden, können zum einen Degradationsprodukte des RirA Regulators sein, oder Proteinkomplexe des RirA Proteins mit anderen Proteinen die nicht vollständig aufgetrennt werden konnten. Die Experimente zeigten, dass der RirA Regulator sowohl mit dem N-terminalem StrepII-Tag als auch mit dem C-terminalem StrepII-Tag erfolgreich produziert werden konnte (Abb. 65). Während der exponentiellen Wachstumsphase ist die Produktion des Regulators unter Verwendung des konstitutiven Promoters und einem N-terminal fusionierten StrepII-Tag etwas stärker verglichen mit dem nativen Promoter und dem C-terminalem StrepII-Tag (Abb. 65). Zu Beginn der stationären Phasen ist die Menge an produziertem Regulator unabhängig vom gewählten Promoter und fusioniertem StrepII-Tag gleich hoch (Abb. 65). Dies zeigte, dass unabhängig von der Position des fusionierten StrepII-Tags aktiver RirA Regulator sowohl mit einem konstitutiven als auch mit einem nativen Promotor produziert wurde. Interessant ist auch, dass die Menge an produziertem RirA eisenunabhängig ist, da sowohl mit Eisen im Medium als auch unter Eisen limitierenden Bedingungen die Menge jeweils gleich blieb.

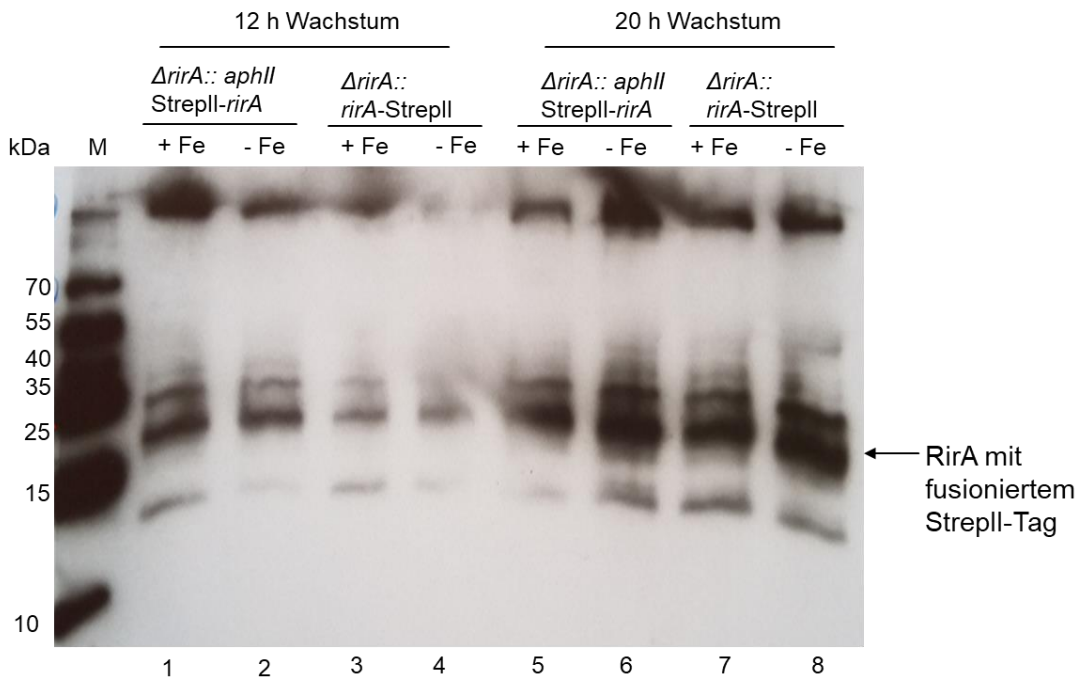


Abb. 65: Westernblot Analyse des komplementierten RirA Regulators mit fusioniertem N- oder C-terminalem StrepII-Tag. Die jeweiligen Stämme wurden mit einer Start OD_{578} von 0,05 in SWM Medium mit $15 \mu M$ $FeSO_4$ (+Fe, Spuren 1, 3, 5 und 7) und ohne die Zugabe von Eisen (-Fe, Spur 2, 4, 6 und 8) angeimpft. Die Spuren 1-4 zeigen die extrahierten Proteine nach 12 h Wachstum und die Spuren 5-8 nach 20 h Wachstum. In den Spuren 1 und 2 sowie 5 und 6 ist der produzierte RirA Regulator aus dem Komplementationskonstrukt mit dem *aphII* Promotor und einem N-terminal fusioniertem Strep-Tag zu sehen. In den Spuren 3 und 4 sowie 7 und 8 der produzierte RirA Regulator mit endogenem Promotor und C-terminal fusioniertem StrepII-Tag. Die extrahierten Proteine wurden in einer 15 %igen SDS PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Das StrepII-RirA Protein mit einer abgeleiteten relativen molekularen Masse von ca. 18 kDa ist mit einem Pfeil markiert.

Das verlangsamte Wachstum im *D. shibae* Wildtypstamm unter Eisenmangel zeigte, dass die Menge an verfügbarem Eisen einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum von Bakterienzellen hat. Die Deletion der *rirA* und *iscR* Regulatorgene hat zudem einen starken Einfluss auf das Wachstumsverhalten unter Eisenmangel.

Während der Kultivierung der Regulatormutantenstämme mit und ohne Zugabe von $15 \mu M$ $FeSO_4$ ins Kulturmedium war aufgefallen, dass sich die Stämme in ihrer Pigmentierung stark unterscheiden (Abb. 66). *D. shibae* ist in der Lage eine aerobe anoxygene Photosynthese zu betreiben und produziert das Carotinoid Spheroidenon sowie Bakteriochlorophyll *a* (Bchl *a*) (Biebl *et al.*, 2005). Somit kann *D. shibae* nicht nur heterotroph im Dunkel wachsen, sondern bei Lichteinstrahlung zusätzliche Energie aus einem Photogradienten durch die Absorption von Licht über Spheroidenon und Bakteriochlorophyll *a* gewinnen. *D. shibae* kann sowohl heterotroph als auch photroph (photoheterotroph) Energie gewinnen (Biebl *et al.*, 2005; Wagner-Döbler & Biebl, 2006).

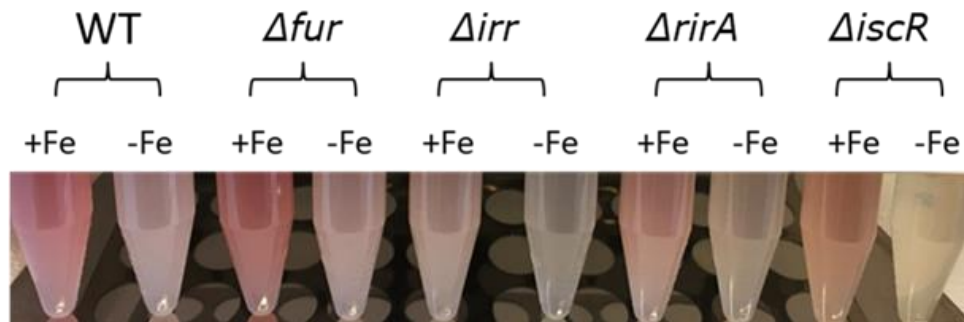


Abb. 66: Vergleich des *D. shibae* Wildtyps mit den Mutanten Δfur , Δirr , $\Delta rirA$ und $\Delta iscR$ bei der Kultivierung in Anwesenheit und Abwesenheit von Eisen. Der *D. shibae* DFL12^T Wildtypstamm ebenso wie die Mutanten wurden bis zur späten Stationären Phase in Salzwasser Medium mit 15 μ M Eisensulfat (+Fe) oder ohne die Zugabe von Eisensulfat (-Fe) kultiviert.

Der *D. shibae* Wildtypstamm zeigte in Anwesenheit von Eisen die charakteristische rosa Färbung (Abb. 66). Unter Eisenmangel wurden die Zellen deutlich schwächer rosa gefärbt. Der Δfur Mutantenstamm zeigte eine dem Wildtypstamm vergleichbare Pigmentierung (Abb. 66). Die Δirr und $\Delta rirA$ Mutantenstämme wiesen in Anwesenheit von Eisen eine schwächere Pigmentierung wie der Wildtypstamm auf. Unter Eisenmangel erschienen die Stämme leicht gräulich und zeigten kaum Pigmentierung (Abb. 66). Für den Irr Regulator aus *Rhodobacter capsulatus* wurde gezeigt, dass er die *hemB* Expression beeinflusst und somit an der Ausbildung von Uroporphyrinogen III einem Vorläuferprodukt von Bakteriochlorophyll beteiligt ist (Yin & Bauer, 2013). Daher könnten auch in *D. shibae* eisenabhängige Regulatoren an der Bakteriochlorophyll oder Carotinoid Biosynthese beteiligt sein.

Den stärksten Unterschied in der Pigmentierung zeigte der $\Delta iscR$ Mutantenstamm. In Anwesenheit von Eisen wies dieser Mutantenstamm eine leicht orange Färbung auf, die sich stark von der rosa Pigmentierung des Wildtyps unterscheidet (Abb. 66). Unter Eisenmangel war der $\Delta iscR$ Mutantenstamm nur noch schwach pigmentiert und zeigte ebenfalls eine helle, gräuliche Färbung (Abb. 66).

Um die Menge an Bakteriochlorophyll und Spheroidenon im Wildtypstamm und dem $\Delta iscR$ Mutantenstamm in An- bzw. Abwesenheit von Eisen, weiter zu untersuchen, wurden die Pigmente durch eine Methanol-Aceton Extraktion isoliert und die Absorption im UV/Vis Spektrometer bestimmt. Der *D. shibae* Wildtypstamm zeigt in der Anwesenheit von Eisen deutliche Absorptionsmaxima bei 360 nm, 480 nm, 585 nm und 770 nm auf (Abb. 67). Das Carotinoid Spheroidenon absorbiert in einem Wellenlängenbereich von 400 bis 600 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 480 nm. Bakteriochlorophyll *a* hingegen absorbiert sowohl im Infrarotbereich bei einer Wellenlänge von 585 und 770 nm

als auch im blauen Spektralbereich bei 360 nm. Das Absorptionsspektrum des *D. shibae* Wildtypstamms kommt daher vom Spheroidenon und Bakteriochlorophyll *a*. Unter Eisenmangel ist beim Wildtypstamm eine geringere Absorption im Bereich des Spheroidenon als auch des Bakteriochlorophyll *a* zu beobachten. Der $\Delta iscR$ Mutantenstamm zeigte im Unterschied zum Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen nur Absorptionsmaxima bei 360 nm, 585 nm und 770 nm, die vom Bakteriochlorophyll *a* kommen (Abb. 67). Es ist keine Absorption des Carotinoid Spheroidenon im Bereich von 480 nm zu finden. Die orangerote Pigmentierung der Flüssigkultur liegt somit an fehlendem Spheroidenon. In Abwesenheit von Eisen sinkt zusätzlich der Gehalt an Bakteriochlorophyll *a* deutlich, da die Absorption bei 585 nm und 770 nm abnimmt. Das Absorptionsmaximum bei 360 nm verschiebt sich zu 400 nm (Abb. 67). Somit ist deutlich weniger Bakteriochlorophyll *a* in dem $\Delta iscR$ Mutantenstamm vorhanden. Die Bakterien verlieren ihre Pigmentierung und erscheinen grau.

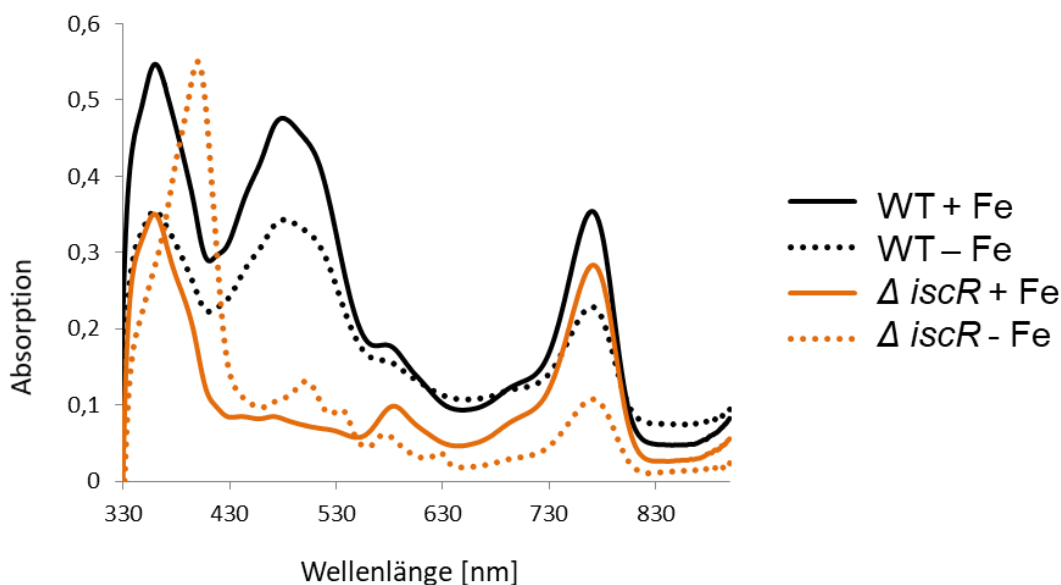


Abb. 67: UV/Vis Spektren der Bakteriochlorophyll Extraktion. Die *D. shibae* Zellen wurden über 24 h in SWM Medium +/- Eisen bei 30 °C kultiviert und eine OD₅₇₈ von 2 entnommen. Nach einer Methanol-Aceton Extraktion wurden die Zellen im UV/Vis in einem Wellenlängenbereich von 330 nm bis 580 nm vermessen. Untersucht wurde der *D. shibae* Wildtypstamm in der Anwesenheit von Eisen (schwarze Kurve) und der Abwesenheit von Eisen (schwarze gestrichelte Kurve), sowie der $\Delta iscR$ Mutantenstamm in der Anwesenheit von Eisen (orange Kurve) und der Abwesenheit von Eisen (orange, gestrichelte Kurve).

Dieses Experiment zeigt, dass durch die schwächere Ausbildung des Spheroidenon im $\Delta iscR$ Mutantenstamm verglichen zum Wildtypstamm, der IscR Regulator an der Regulation der Spheroidenon Produktion beteiligt ist. Unter Eisenmangel konnte die Akkumulation eines nicht identifizierten Zwischenprodukts bei einer Wellenlänge von 400 nm im UV/Vis Spektrometer beobachtet werden.

4.7 Rolle der Regulatoren RirA und IscR bei der eisenabhängigen Genregulation

Um die Rolle der Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR von *D. shibae* bei der eisenabhängigen Genexpression zu definieren, wurde deren Einfluss auf Transkriptebene mittels DNA Arrays untersucht. Hierzu wurden vergleichend zu dem *D. shibae* Wildtypstamm die $\Delta rirA$ und $\Delta iscR$ Mutantenstämme mit bzw. ohne Zugabe von 15 μM FeSO_4 ins Salzwasser Medium kultiviert und RNA für die Array Analyse präpariert. Die DNA Array Analysen der $\Delta rirA$ und $\Delta iscR$ Mutanten sowie die Auswertung der Daten erfolgte in dieser Arbeit. Die DNA Array Daten der Δfur und Δirr Mutanten wurden von Jenny Jacobs zur Verfügung gestellt (Jacobs, TU Braunschweig, unveröffentlichte Daten).

Bei allen vier eisenabhängigen Regulatoren zeigte die Auswertung der DNA Array Daten, dass keinem der Regulatoren nur eine Form der Regulation zugewiesen werden konnte. In Anwesenheit von Eisen wurde neben der Repression (*holo*-Repressor) auch Aktivierung (*holo*-Aktivator) beobachtet. Zudem wurde in Abwesenheit von Eisen ebenfalls eine Aktivierung (*apo*-Aktivierung) gefunden. Zusätzlich lieferte die Auswertung der Array Daten Hinweise darauf, dass die Genexpression vieler Gene nicht nur von einem Regulator sondern von mehreren reguliert wird. In der folgenden Regulon Definition wurden zunächst nur Gene betrachtet, die ausschließlich von einem Regulator beeinflusst wurden.

4.7.1 Das RirA Regulon

Eine Betrachtung der in *D. shibae* durch RirA regulierten Gene zeigte, dass 24 Gene in den DNA Arrays einen direkten Einfluss von RirA zeigten (Tabelle 17). Beim RirA Regulator konnten alle oben beschriebenen Formen der Regulation identifiziert werden. Das Gen *Dshi_1477*, welches für ein „Usg family protein“ codiert, wurde in Anwesenheit von Eisen durch RirA reprimiert (Abb. 68 und Tabelle 17, *holo*-RirA Repressor). Drei weitere Gene (*Dshi_0598*, *Dshi_1899* und *Dshi_3928*) wurden in Anwesenheit von Eisen aktiviert (Abb. 68 und Tabelle 17, *holo*-RirA Aktivator). Darüber hinaus wurden 20 Gene gefunden, die in Abwesenheit von Eisen durch RirA aktiviert wurden (Abb. 68 und Tabelle 17, *apo*-RirA Aktivierung). Jede dieser Formen zeigte ein charakteristisches Expressionsmuster in den DNA Array Analysen.

Durch die RirA abhängige Repression des *Dshi_1477* Gens, wurden im Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen geringere Transkriptmengen detektiert wie in Abwesenheit von Eisen. Hieraus ergab sich ein log2 FC von ca. 1 (Tabelle 17, *holo*-RirA Repressor,

WT+Fe/WT-Fe). Dies ist auch der Fall, wenn die Transkriptmengen aus dem $\Delta rirA$ Mutantenstamm mit denen aus dem Wildtypstamm verglichen wurde (Tabelle 17, WT+Fe/ $\Delta rirA$ +Fe und WT+Fe/ $\Delta rirA$ -Fe). Da in Anwesenheit von Eisen die Transkriptmenge im Wildtypstamm deutlich geringer ist als die Transkriptmenge im $\Delta rirA$ Mutantenstamm, deutet dies auf eine *holo*-RirA Repression in Anwesenheit von Eisen hin, die in der Mutante verloren geht. In Abwesenheit von Eisen entspricht die Transkriptmenge im Wildtypstamm denen im $\Delta rirA$ Mutantenstamm, mit log2 FC Werten von ca. 0, da in Abwesenheit von Eisen keine Repression durch *holo*-RirA stattfindet ebenso wie im Mutantenstamm (Tabelle 17, WT-Fe/ $\Delta rirA$ +Fe und WT-Fe/ $\Delta rirA$ -Fe). Die Transkriptmenge im $\Delta rirA$ Mutantenstamm war sowohl in An-als auch in Abwesenheit von Eisen gleich ($\Delta rirA$ +Fe/ $\Delta rirA$ -Fe).

Die Transkriptomanalysen zeigten ebenfalls, dass der RirA Regulator in Anwesenheit von Eisen in seiner *holo*-Form die Expression der Gene *Dshi_0598*, *Dshi_1899* und *Dshi_3928* aktiviert. Dabei codiert das Gen *Dshi_0598* für ein „multidrug resistance efflux pump-like protein“, das *Dshi_1899* Gen für eine „homocysteine S-methyltransferase“ und das *Dshi_3928* Gen für eine „short-chain dehydrogenase/reductase SDR“ (Tabelle 17, *holo*-RirA Aktivator). In Anwesenheit von Eisen ist die Transkriptmenge im Wildtypstamm höher als unter Eisenmangel. Hieraus ergibt sich ein log2 FC von ca. -1 (Tabelle 17, WT+Fe/WT-Fe). Ein Vergleich der Transkriptmengen aus dem Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen mit dem Transkriptlevel im $\Delta rirA$ Mutantenstamm ergeben ebenfalls log2 FC Werte von ca. -1 (Tabelle 17, WT+Fe/ $\Delta rirA$ +Fe und WT+Fe/ $\Delta rirA$ -Fe). Dies deutet darauf hin, dass *apo*-RirA in Anwesenheit von Eisen die Genexpression aktiviert was zu einem erhöhten Transkriptlevel im Wildtypstamm führt. Im Mutantenstamm geht diese Form der Aktivierung verloren und das Transkriptlevel bleibt gering. In Abwesenheit von Eisen war das Transkriptlevel im Wildtypstamm in etwa gleich hoch wie das Transkriptlevel im $\Delta rirA$ Mutantenstamm mit log2 FC Werten um 0, da in beiden Stämme keine *holo*-RirA Aktivierung der Genexpression stattfand (Tabelle 17, WT-Fe/ $\Delta rirA$ +Fe und WT-Fe/ $\Delta rirA$ -Fe). Im $\Delta rirA$ Mutantenstamm entspricht das Transkriptlevel in Anwesenheit von Eisen dem in Abwesenheit von Eisen (Tabelle 17, $\Delta rirA$ +Fe/ $\Delta rirA$ -Fe).

Die dritte gefundene Form der Regulation zeigte den aktivierenden Einfluss des RirA Regulators unter Eisenmangel auf die Expression von 20 Genen (Abb. 68 und Tabelle 17, *apo*-RirA Aktivator). Dazu zählen unter anderem die Gene *Dshi_0143*, welches für ein

„nitrogen regulatory protein P-II“ GlnK codiert, *Dshi_1442*, welches für eine Peroxidase codiert und *Dshi_2306*, welches für einen „BadM/Rrf2 family transcriptional regulator/nitric oxide-sensitive transcriptional repressor“ codiert. Die Transkriptmenge ist im *D. shibae* Wildtypstamm in Abwesenheit von Eisen war deutlich höher als in Anwesenheit von Eisen. Daraus ergab sich ein log2 FC von ca. 1 (Tabelle 17, WT+Fe/WT-Fe). Im $\Delta rirA$ Mutantenstamm war sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Eisen ein vergleichbares Transkriptlevel wie im Wildtypstamm detektiert worden. Dies resultierte in log2 FC Werten von ca. 0 (Tabelle 17, WT+Fe/ $\Delta rirA$ +Fe und WT+Fe/ $\Delta rirA$ -Fe). Das erhöhte Transkriptlevel im Wildtypstamm unter Eisenmangel durch die *apo-RirA* Aktivierung konnte im $\Delta rirA$ Mutantenstamm nicht beobachtet werden. Die log2 FC Werte von ca. -1 weisen auf eine fehlende Aktivierung durch *apo-RirA* in Abwesenheit von Eisen hin (Tabelle 17, WT-Fe/ $\Delta rirA$ +Fe, WT-Fe/ $\Delta rirA$ -Fe). Im $\Delta rirA$ Mutantenstamm entspricht das Transkriptlevel in Anwesenheit von Eisen dem in Abwesenheit von Eisen (Tabelle 17, $\Delta rirA$ +Fe/ $\Delta rirA$ -Fe).

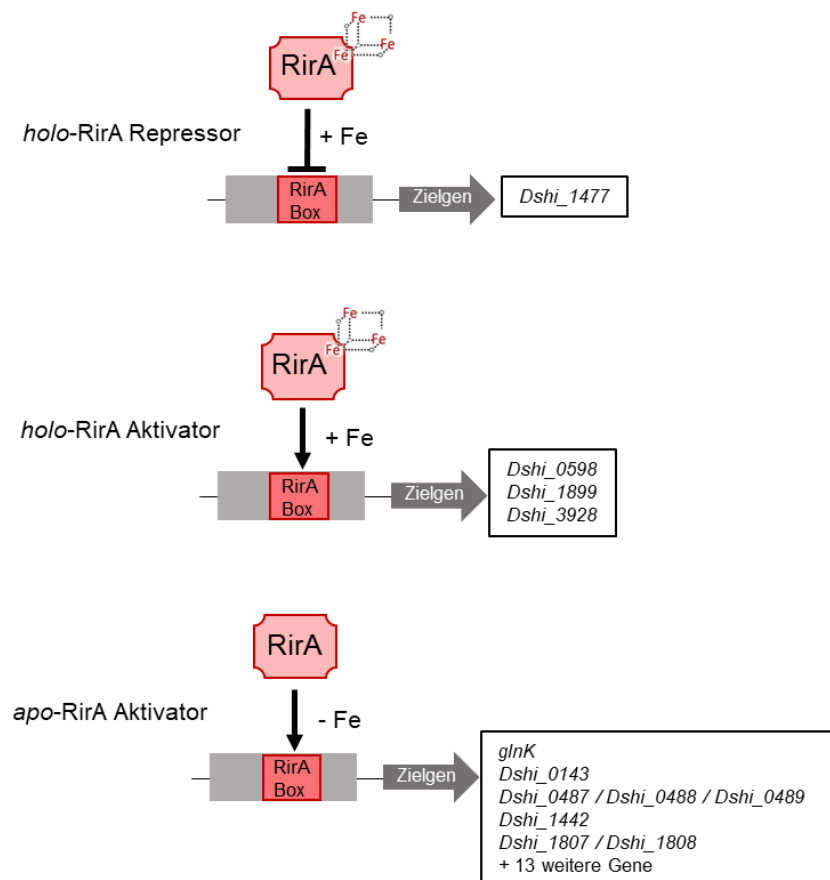


Abb. 68: Schematische Darstellung des RirA Regulons. Die drei beobachteten Mechanismen der RirA-Regulation mit den jeweiligen regulierten Genen sind gezeigt.

Die hier im RirA Regulon gefundenen Gene zeigen alle keinen direkten Zusammenhang mit dem Eisenmetabolismus auf. Eventuell handelt es sich um sekundäre Effekte, die durch den Eisenmangel und RirA verursacht werden.

In keinem Promotorbereich der im RirA Regulon identifizierten Gene wurde die in vorherigen Experimenten ermittelte Bindestelle TTAA-N₁₀-AATT identifiziert. Allerdings wurde in einigen Promotorbereichen eine leicht abgewandelte Bindesequenz gefunden, die bereits in anderen Organismen als IRO Box identifiziert worden war (Rodionov *et al.*, 2006). Das Sequenz Motiv 5'-TGA-N₉-TCA-3' wurde in teilweise leicht variierten Form in den Genen *Dshi_1899* (5'-TGA-N₁₀-TCA-3'), *Dshi_3928*, *Dshi_0489* (5'-TGA-N₉-TAA-3'), *Dshi_2306* und *Dshi_2463* (5'-TGA-N₉-TCG-3') identifiziert. Allerdings zeigten viele der durch RirA regulierten Gene weder die neu identifizierte Bindestelle 5'-TTAA-N₁₀-AATT-3' noch die bereits bekannte Bindestelle 5'-TGA-N₉-TCA-3'.

Tabelle 17: **RirA Regulon.** Die angegebenen Werte entsprechen dem log2 FC.

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe/ WT-Fe	WT+Fe/ Δ rirA+Fe	WT+Fe/ Δ rirA-Fe	WT-Fe/ Δ rirA+Fe	WT-Fe/ Δ rirA-Fe	Δ rirA+Fe/ Δ rirA-Fe
holo-RirA Repressor								
<i>Dshi_1477</i>	Usg family protein		1,00	0,98	1,47	-0,04	0,35	0,50
holo-RirA Aktivator								
<i>Dshi_1899</i>	multidrug resistance efflux pump-like protein		-1,24	-0,83	-1,22	0,38	0,18	-0,42
<i>Dshi_3928</i>	homocysteine S-methyltransferase		-1,16	-1,21	-1,74	-0,12	-0,62	-0,49
<i>Dshi_0598</i>	short-chain dehydrogenase/reductase SDR		-0,86	-1,13	-1,40	-0,39	-0,66	-0,09
apo-RirA Aktivator								
<i>Dshi_0143</i>	nitrogen regulatory protein P-II	<i>glnK</i>	0,90	0,07	-0,13	-1,32	-1,52	-0,14
<i>Dshi_0487</i>	hypothetical protein		0,92	-0,51	-0,21	-1,46	-1,15	0,36
<i>Dshi_0488</i>	hypothetical protein		0,95	-0,69	-0,54	-1,69	-1,30	0,36
<i>Dshi_0489</i>	hypothetical protein		0,84	-0,75	-0,35	-1,65	-1,16	0,46
<i>Dshi_1442</i>	peroxidase		0,82	-0,76	-0,36	-1,62	-1,06	0,53
<i>Dshi_1807</i>	UspA domain-containing protein		1,04	-0,54	0,11	-1,61	-1,07	0,50
<i>Dshi_1808</i>	amino acid carrier protein		1,05	-0,40	0,07	-1,58	-1,08	0,46
<i>Dshi_1908</i>	hypothetical protein		0,80	-0,50	-0,46	-1,28	-1,41	-0,13
<i>Dshi_2306</i>	BadM/Rrf2 family transcriptional regulator		1,08	-0,35	-0,05	-1,26	-1,01	0,22
<i>Dshi_2457</i>	hypothetical protein		0,87	-0,34	-0,27	-1,34	-1,26	0,04
<i>Dshi_2458</i>	hypothetical protein		1,08	-0,68	-0,44	-2,00	-1,66	0,39
<i>Dshi_2460</i>	GPW/gp25 family protein		1,29	-0,73	-0,46	-2,12	-1,80	0,12
<i>Dshi_2461</i>	PAAR repeat-containing protein		1,08	-0,45	-0,30	-1,28	-1,23	0,14
<i>Dshi_2462</i>	Rhs element Vgr protein		1,07	-0,74	-0,68	-1,88	-1,67	0,19
<i>Dshi_2463</i>	hypothetical protein		1,20	-0,74	-0,64	-2,03	-1,90	0,12
<i>Dshi_3152</i>	hypothetical protein		1,12	0,00	0,13	-0,99	-1,07	0,13
<i>Dshi_3153</i>	TRAP dicarboxylate transporter-DctP subunit		1,17	-0,03	0,55	-1,17	-1,16	0,43
<i>Dshi_3154</i>	TRAP transporter, transmembrane protein, putative		1,91	-0,10	0,39	-1,95	-1,40	0,53
<i>Dshi_3155</i>	TRAP dicarboxylate transporter, DctM subunit		1,37	-0,14	0,32	-1,54	-1,00	0,46
<i>Dshi_3156</i>	hypothetical protein		1,26	-0,16	-0,12	-1,44	-0,90	0,16

4.7.2 Das IscR Regulon

Der IscR Regulator aus *D. shibae* unterscheidet sich stark von anderen IscR Regulatoren, da er anstelle eines Fe-S Clusters ein Häm bindet, um den Gehalt an verfügbarem Eisen in der Zelle zu messen. In *D. shibae* werden 23 Gene ausschließlich durch IscR reguliert (Tabelle 18). Drei von ihnen wurden in Anwesenheit von Eisen durch IscR reprimiert (Abb. 69 und Tabelle 18, *holo* IscR Repressor). Zwölf weitere Gene wurden in Anwesenheit von Eisen aktiviert (Abb. 69 und Tabelle 18, *holo* IscR Aktivator). Darüber hinaus wurden 8 weitere Gene gefunden, die in Abwesenheit von Eisen durch IscR aktiviert wurden (Abb. 69 und Tabelle 18, *apo*-IscR Aktivator).

Zu den durch *holo*-IscR reprimierten Genen zählt neben den Genen *Dshi_2465* und *Dshi_2050* auch das *Dshi_2689* Gen, welches für die „cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit II“ CydB codiert (Tabelle 18, *holo*-IscR Repressor). Im Wildtypstamm wurden in Anwesenheit von Eisen geringere Transkriptmengen detektiert wie ohne Eisen. Es ergab sich ein log2 FC von ca. 1 (Tabelle 18, WT+Fe/WT-Fe). Dies ist auch der Fall, wenn die Transkriptmengen aus dem Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen mit den Transkriptmengen aus dem Δ *iscR* Mutantenstamm verglichen wurden (Tabelle 18, WT+Fe/ Δ *iscR*+Fe und WT+Fe/ Δ *iscR*-Fe). Die *holo*-IscR Repression wird deutlich durch die geringe Transkriptmenge in Anwesenheit von Eisen im Wildtypstamm, verglichen mit der hohen Transkriptmenge im Δ *iscR* Mutantenstamm in Anwesenheit von Eisen. Ohne den IscR Regulator konnte keine Repression mehr stattfinden und das Transkriptlevel stieg an. Unter Eisenmangel ist das Transkriptlevel im Wildtyp niedrig und vergleichbar mit den Transkriptmengen im Δ *iscR* Mutantenstamm. Daraus resultieren log2 FC Werte von ca. 0 (Tabelle 18, WT-Fe/ Δ *iscR*+Fe und WT-Fe/ Δ *iscR*-Fe). Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Eisen blieb die Transkriptmenge im Δ *iscR* Mutantenstamm gleich mit log2 FC Werten um 0 (Tabelle 18, Δ *iscR*+Fe/ Δ *iscR*-Fe).

Ebenfalls in Anwesenheit von Eisen kann *holo*-IscR auch als Aktivator fungieren und reguliert so 12 Gene in *D. shibae*. Hierzu zählen unter anderem das *Dshi_0086* Gen, welches für ein „SOUL heme-binding protein“ codiert, das *Dshi_0505* Gen, welches für ein „4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding domain-containing protein“ FdnH codiert, das *Dshi_0508* Gen, welches für ein „cytochrome c class I“ codiert, das *Dshi_0661* Gen, welches für eine „cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I“ codiert und das *Dshi_2067* Gen, welches für einen „sulphate transporter“ codiert (Tabelle 18, *holo*-IscR Aktivator).

In Anwesenheit von Eisen waren die Transkriptlevel im Wildtypstamm deutlich höher als unter Eisenmangel. Daraus ergab sich ein log₂ FC Wert von ca. -1 (Tabelle 18, WT+Fe/WT-Fe). Ähnliche log₂ FC Werte um -1 ergaben sich auch bei einem Vergleich der Transkriptmengen im Wildtypstamm mit Eisen mit den Transkriptmengen im $\Delta iscR$ Mutantenstamm (Tabelle 18, WT+Fe/ $\Delta iscR$ +Fe und WT+Fe/ $\Delta iscR$ -Fe). Unter Eisenmangel hingegen waren die Transkriptmengen im Wildtypstamm deutlich niedriger und entsprachen in etwa den Transkriptmengen im $\Delta iscR$ Mutantenstamm, mit log₂ FC Werten um 0 (Tabelle 18, WT-Fe/ $\Delta iscR$ +Fe, WT-Fe/ $\Delta iscR$ -Fe). In Anwesenheit von Eisen fehlt im $\Delta iscR$ Mutantenstamm die *holo*-IscR Aktivierung der Genexpression, wie sie im Wildtypstamm beobachtet wurde. Daher blieben die Transkriptmengen gering. Im $\Delta iscR$ Mutantenstamm waren die Transkriptmengen unabhängig von der Eisenverfügbarkeit gleich, Es ergab sich ein log₂ FC Wert von ca. 0 (Tabelle 18, $\Delta iscR$ +Fe/ $\Delta iscR$ -Fe).

Neben der *holo*-IscR Repression und Aktivierung wurden auch Gene identifiziert deren Genexpression durch die *apo*-Form von IscR aktiviert wurde. Zu diesen acht Genen zählen unter anderem die *virB8* und *virB10* Gene sowie das *Dshi_1449* Gen, welches für einen TonB Rezeptor codiert (Tabelle 18, *apo*-IscR Aktivierung). Im Wildtypstamm wurden in Abwesenheit von Eisen geringere Transkriptmengen als unter Eisenmangel detektiert. Es ergab sich ein log₂ FC Wert von ca. 1, für das *Dshi_2022* Gen von 4,95 (Tabelle 18, WT+Fe/WT-Fe). Im $\Delta iscR$ Mutantenstamm waren ähnlich geringe Transkriptmengen wie im Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen detektiert worden. Es ergaben sich log₂ FC Werte um 0 (Tabelle 18, WT+Fe/ $\Delta iscR$ +Fe und WT+Fe/ $\Delta iscR$ -Fe). Aufgrund des fehlenden IscR Regulators im $\Delta iscR$ Mutantenstamm kann in Abwesenheit von Eisen keine Aktivierung durch *apo*-IscR stattfinden, wie sie im Wildtypstamm beobachtet worden war und das Transkriptlevel bleibt niedrig. Ein Vergleich der Transkriptmengen im $\Delta iscR$ Mutantenstamm mit der Transkriptmenge im Wildtypstamm in Abwesenheit von Eisen, zeigt ebenfalls die fehlende Aktivierung durch *apo*-IscR im Mutantenstamm. Es ergeben sich log₂ FC Werte von ca. -1 und für das *Dshi_2022* Gen von ca. -5 (Tabelle 18, WT-Fe/ $\Delta iscR$ +Fe und WT-Fe/ $\Delta iscR$ -Fe). Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Eisen blieb die Transkriptmenge im $\Delta iscR$ Mutantenstamm gleich mit log₂ FC Werten um 0 (Tabelle 18, $\Delta iscR$ +Fe/ $\Delta iscR$ -Fe).

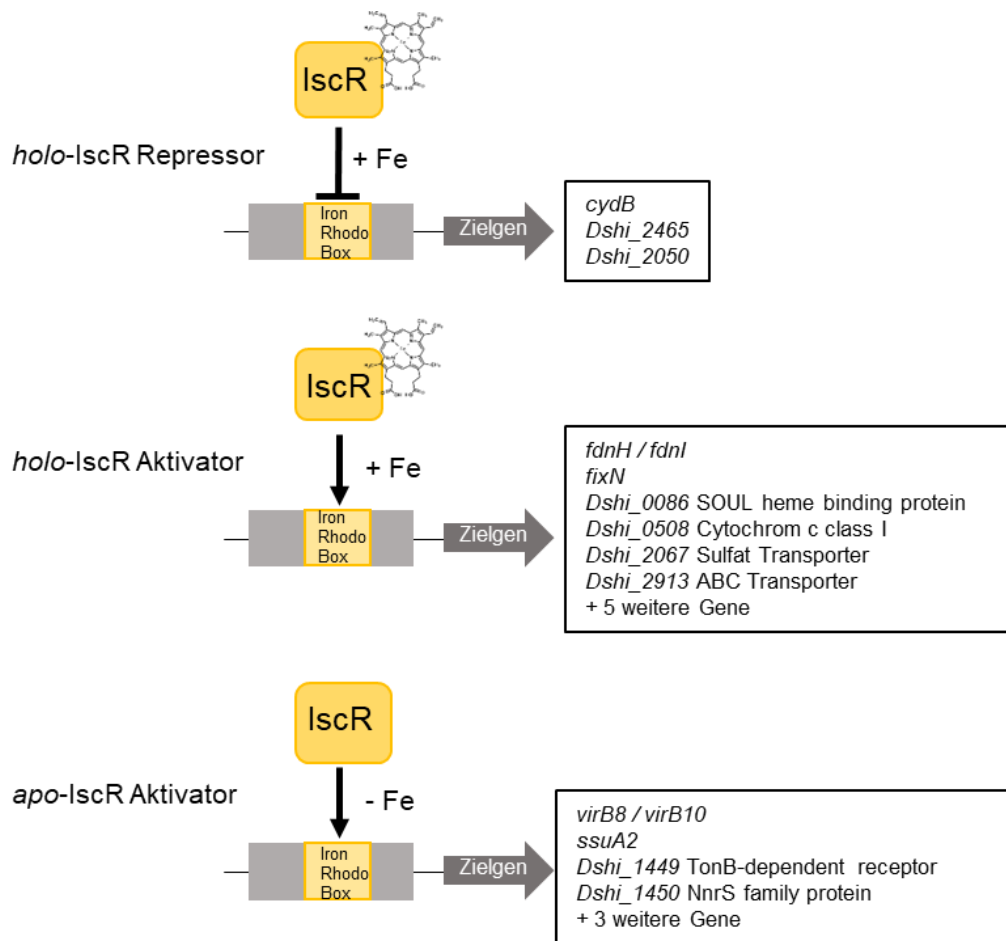
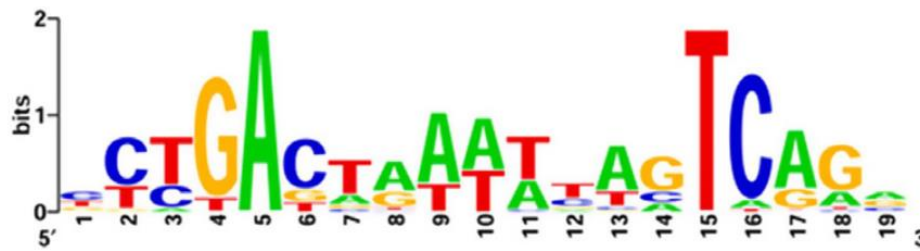


Abb. 69: Schematische Darstellung des IscR Regulons. Die drei beobachteten Mechanismen der IscR-Regulation mit den jeweiligen regulierten Gene sind gezeigt.

In dem hier definierten IscR Regulon finden sich einige Gene, die vom Eisenmetabolismus abhängig sind wie Cytochrome oder Proteine mit Fe-S Clustern, die durch IscR direkt reguliert werden.

Die Iron Rhodo Box die bioinformatisch in vielen Alphaproteobakterien als Bindesequenz für den IscR Regulator identifiziert werden konnte, wurde auch in vier der durch IscR regulierten Gene gefunden (Abb. 70 A) (Rodionov *et al.*, 2006). Das Sequenzmotiv 5'-TGA-N₉-TCA-3' bzw. 5'-TGA-N₉-TCG-3' wurde im Promotorbereich der Gene *Dshi_2689*, *Dshi_0503*, *Dshi_0508* und *Dshi_2055* identifiziert.

[A]



[B]

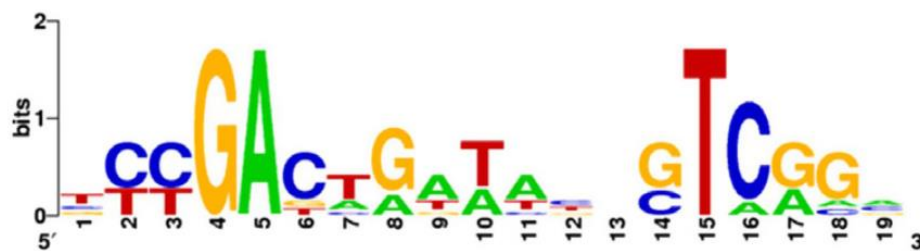


Abb. 70: Iron Rhodo Box Motiv als potentielle Bindestelle für IscR. A: Iron Rhodo Box, wie sie in verschiedenen Alphaproteobakterien gefunden worden ist (Rodionov *et al.*, 2006). B: Iron Rhodo Box aus *R. sphaeroides* (Remes *et al.*, 2015).

In 14 weiteren Genen wurde eine leicht abgewandelte Motif der Iron Rhodo Box gefunden, welches bereits als Bindemotiv des IscR Regulators aus *R. sphaeroides* definiert wurde (Abb. 70 B) (Remes *et al.*, 2015). Das Motiv 5'-GA-N₉-TC-3' wurde im Promotorbereich des Gens *Dshi_2465*, welches durch *holo*-IscR als Repressor reguliert wird, identifiziert. In den Genen, die durch *holo*-IscR aktiviert wurden, wurden in den Promotorbereichen der Gene *Dshi_0086*, *Dshi_0505*, *Dshi_0612*, *Dshi_0661*, *Dshi_2067*, *Dshi_2746*, *Dshi_2913* und *Dshi_3035* das Motiv 5'-GA-N₉-TC-3' gefunden. Im Promotorbereich der Gene *Dshi_1453*, *Dshi_2562*, *Dshi_3647*, *Dshi_3650* und *Dshi_3982*, deren Genexpression durch *apo* IscR aktiviert wurde, weisen ebenfalls das Bindemotiv 5'-GA-N₉-TC-3' auf. Nur in den fünf Genen *Dshi_2050*, *Dshi_0506*, *Dshi_1449*, *Dshi_1450* und *Dshi_2022* wurde keine der beiden Bindestellen gefunden.

Diese Analyse weist auf die wichtige Bedeutung von IscR für die Anpassung an Eisenmangel von *D. shibae* hin.

Tabelle 18: IscR Regulon. Die angegebenen Werte entsprechen dem log2 FC

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe/ WT-Fe	WT+Fe/ Δ iscR+Fe	WT+Fe/ Δ iscR-Fe	WT-Fe/ Δ iscR+Fe	WT-Fe/ Δ iscR-Fe	Δ iscR+Fe/ Δ iscR-Fe
holo-IscR Repressor								
<i>Dshi_2465</i>	phage tail protein		1,16	1,18	0,84	0,06	-0,47	-0,32
<i>Dshi_2050</i>	hypothetical protein		1,30	1,11	0,87	0,26	0,00	-0,24
<i>Dshi_2689</i>	cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit II	<i>cydB</i>	1,42	0,98	1,14	-0,39	-0,20	-0,04
holo-IscR Aktivator								
<i>Dshi_0086</i>	SOUL heme-binding protein		-1,24	-0,92	-1,60	0,43	-0,35	-0,77
<i>Dshi_0503</i>	twin-arginine translocation pathway signal		-1,47	-1,98	-1,07	-0,59	0,25	0,78
<i>Dshi_0505</i>	4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding domain-containing protein	<i>fdnH</i>	-1,46	-1,55	-1,22	-0,13	0,17	0,29
<i>Dshi_0506</i>	formate dehydrogenase, gamma subunit	<i>fdnI</i>	-1,39	-1,37	-1,27	0,02	-0,05	-0,03
<i>Dshi_0508</i>	cytochrome c class I		-1,08	-1,32	-1,28	-0,40	-0,33	0,12
<i>Dshi_0612</i>	beta-lactamase domain-containing protein		-1,34	-1,56	-1,13	-0,01	0,12	0,45
<i>Dshi_0661</i>	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I	<i>fixN</i>	-1,03	-1,25	-0,94	-0,27	0,03	0,28
<i>Dshi_2055</i>	glutathione peroxidase		-1,05	-1,24	-0,93	-0,25	0,39	0,30
<i>Dshi_2067</i>	sulphate transporter		-1,03	-1,19	-0,97	-0,17	0,05	0,19
<i>Dshi_2746</i>	hypothetical protein		-1,47	-1,19	-1,12	0,06	0,28	0,05
<i>Dshi_2913</i>	ABC transporter related		-0,84	-0,92	-0,99	-0,45	-0,13	-0,25
<i>Dshi_3035</i>	hypothetical protein		-1,25	-0,91	-1,14	0,29	0,03	-0,25
apo IscR Aktivator								
<i>Dshi_1449</i>	TonB-dependent receptor		1,76	0,46	0,33	-1,22	-1,35	-0,13
<i>Dshi_1450</i>	NnrS family protein		0,89	-0,12	-0,43	-0,97	-1,07	-0,29
<i>Dshi_1453</i>	putative sulfonate/nitrate transport system substrate-binding protein	<i>ssuA2</i>	1,72	0,09	-0,24	-1,53	-1,84	-0,34
<i>Dshi_2022</i>	hypothetical protein		4,95	-0,08	-0,26	-5,06	-4,94	-0,22
<i>Dshi_2562</i>	hypothetical protein		0,90	-0,04	-0,20	-0,84	-1,00	-0,23
<i>Dshi_3647</i>	conjugation TrbI family protein	<i>virB10</i>	0,85	-0,42	-0,11	-1,23	-0,93	0,14
<i>Dshi_3650</i>	hypothetical protein		0,92	-0,12	-0,15	-0,94	-1,04	0,04
<i>Dshi_3982</i>	conjugation TrbI family protein	<i>virB8</i>	0,89	-0,62	-0,22	-1,51	-1,10	0,09

4.7.3 Das Fur Regulon

Für den Fur Regulator wurden 130 Gene identifiziert, die in den DNA Array Analysen (J. Jacobs, TU Braunschweig, unveröffentlichte Daten) allein durch Fur reguliert wurden. Vier der Gene wurden in Anwesenheit von Eisen reprimiert (Abb. 71 und Tabelle 19, *holo-Fur* Repression). Darüber hinaus wurden 14 Gene in Anwesenheit von Eisen aktiviert (Abb. 71 und Tabelle 19, *holo-Fur* Aktivator). Die übrigen 112 identifizierten Gene wurden in Abwesenheit von Eisen aktiviert (Abb. 71 und Tabelle 19, *apo-Fur* Aktivator).

Die vier Gene *Dshi_2676*, *Dshi_2189* (*cpdB*), *Dshi_3684* und *Dshi_0244* (*adh*) wurden durch *holo-Fur* reprimiert (Tabelle 19, *holo-Fur* Repressor). In Anwesenheit von Eisen ist die Transkriptmenge im Wildtypstamm geringer als in Abwesenheit von Eisen. Dies ergab sich aus log₂ FC Werten zwischen 1 und 3,25 (Tabelle 19, WT+Fe/WT-Fe). Dies ist auch der Fall wenn die Transkriptmengen aus dem Δfur Mutantenstamm mit denen aus dem Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen verglichen wurden. Es ergaben sich log₂ FC Werte von ca. 1 (Tabelle 19, WT+Fe/ Δfur +Fe und WT+Fe/ Δfur -Fe). Diese entstehen durch das geringe Transkriptlevel im Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen verglichen mit den Transkriptleveln im Δfur Mutantenstamm. Ohne den Fur Regulator fand unabhängig vom Eisengehalt keine Repression statt. Unter Eisenmangel steigt die Transkriptmenge im Wildtypstamm für die Gene *Dshi_2676* und *Dshi_2189* und ist vergleichbar mit der Transkriptmenge im Δfur Mutantenstamm. Es ergaben sich log₂ FC Werte um 0 (Tabelle 19, WT-Fe/ Δfur +Fe und WT-Fe/ Δfur -Fe). Für die Gene *Dshi_3684* und *Dshi_0244* hingegen, war das Transkriptlevel im Δfur Mutantenstamm deutlich geringer als im Wildtypstamm, was in log₂ FC Werten von ca. -1 bis -3 resultierte (Tabelle 19, WT-Fe/ Δfur +Fe und WT-Fe/ Δfur -Fe). Die Transkriptmengen im Δfur Mutantenstamm sind unabhängig vom Eisengehalt gleich. Daher ergaben sich auch hier log₂ FC Werte von ca. 0 (Tabelle 19, Δfur +Fe/ Δfur -Fe).

Neben der *holo-Fur* Repression wurde bei 14 Genen eine *holo-Fur* Aktivierung beobachtet (Tabelle 19, *holo-Fur* Aktivator). In Anwesenheit von Eisen ist die Transkriptmenge im Wildtypstamm deutlich höher als unter Eisenmangel, dies zeigt sich durch log₂ FC Werte von ca. -0,8 bis -2 (Tabelle 19, WT+Fe/WT-Fe). Die Transkriptmengen im Δfur Mutantenstamm sind ebenfalls deutlich geringer als im Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen. Es ergaben sich log₂ FC Werte von ca. -1 (Tabelle 19, WT+Fe/ Δfur +Fe und

WT+Fe/ Δfur -Fe). *Holo*-Fur aktiviert in Gegenwart von Eisen die Genexpression im Wildtypstamm, während im Δfur Mutantenstamm diese Aktivierung fehlt. In Abwesenheit von Eisen war das detektierte Transkriptlevel im Wildtypstamm vergleichbar mit dem Transkriptlevel im Δfur Mutantenstamm mit log2 FC Werten um 0 (Tabelle 19, WT-Fe/ Δfur +Fe und WT-Fe/ Δfur -Fe). Hier fehlt die eiseninduzierte Aktivierung durch *holo*-Fur im Wildtyp ebenso wie im Δfur Mutantenstamm. Mit log2 FC Werte um 0, war das Transkriptlevel im Δfur Mutantenstamm unabhängig von der verfügbaren Eisenmenge gleich (Tabelle 19, Δfur +Fe/ Δfur -Fe).

Die meisten dem Fur-Regulon zugeordneten Gene wurden durch *apo*-Fur aktiviert. Diese Form der Regulation wurde bei 112 Genen beobachtet (Tabelle 19, *apo*-Fur Aktivator). Im Wildtypstamm wurden unter Eisenmangel geringere Transkriptmengen detektiert wie ohne Eisen. Es ergaben sich log2 FC Werte von ca. 1 bis 3 (Tabelle 19, WT+Fe/WT-Fe). Durch den fehlenden Fur Regulator im Δfur Mutantenstamm findet keine Aktivierung statt und das Transkriptlevel bleibt niedrig ähnlich wie im Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen. Dies wird deutlich durch log2 FC Werte um 0 (Tabelle 19, WT+Fe/ Δfur +Fe und WT+Fe/ Δfur -Fe). Im Wildtypstamm ohne Eisen kommt es zur Aktivierung der Genexpression durch *apo*-Fur und die Transkriptmenge steigt. Im Δfur Mutantenstamm hingegen bleibt die Transkriptmenge niedrig. Dies resultiert in log2 FC Werten von ca. -1 bis -3,5 (Tabelle 19, WT-Fe/ Δfur +Fe und WT-Fe/ Δfur -Fe). Im Δfur Mutantenstamm blieb das Transkriptlevel unabhängig vom Eisengehalt gleich. Dies zeigte sich durch log2 FC Werte um 0 (Tabelle 19, Δfur +Fe/ Δfur -Fe).

In Gram negativen Bakterien ist das am weitesten verbreitete Modell der Regulation von Fur seine Repressor Funktion mit gebundenem Fe²⁺ in seiner *holo*-Form (Braun *et al.*, 1998). Allerdings wurden auch die Aktivierung durch sowohl *holo*-Fur als auch *apo*-Fur in *E. coli* gezeigt (Seo *et al.*, 2014).

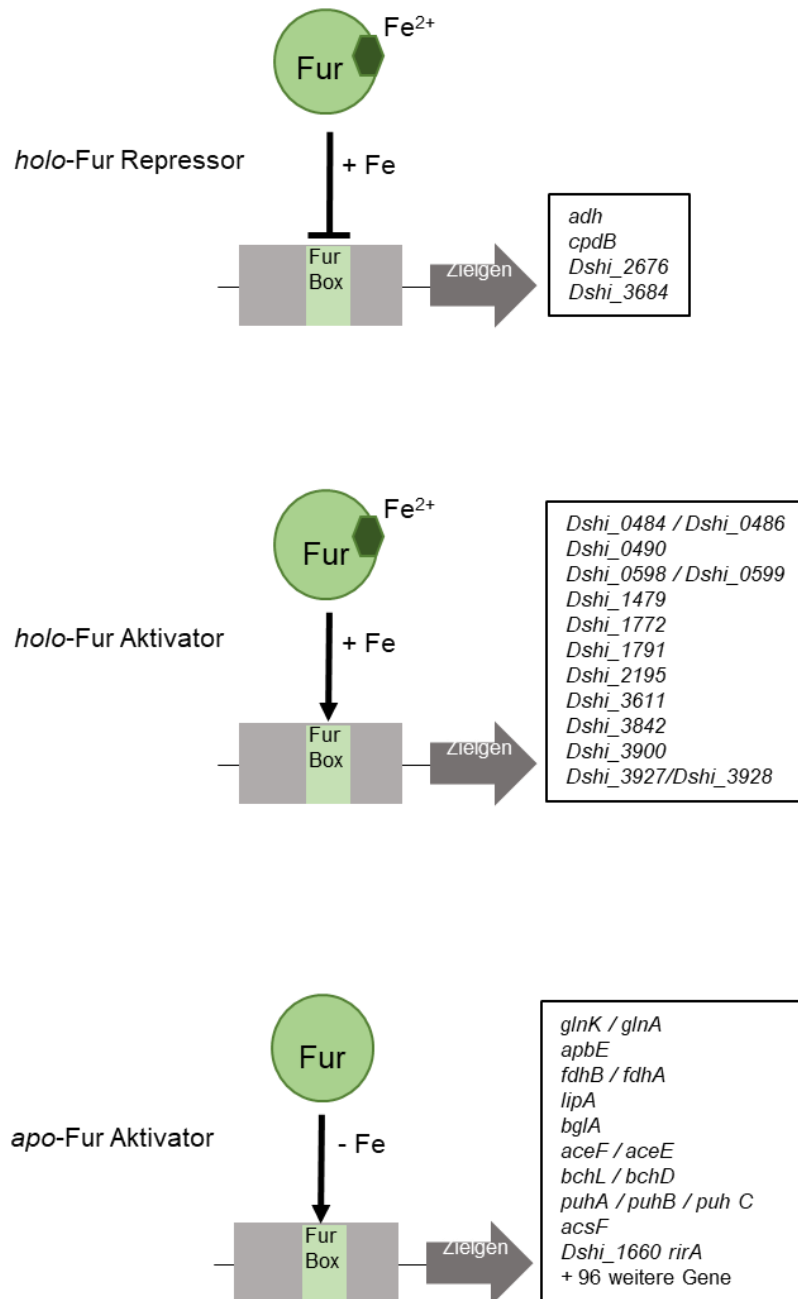
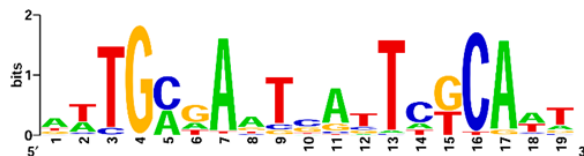


Abb. 71: Schematische Darstellung des Fur Regulons. Die drei beobachteten Mechanismen der Fur-Regulation mit den jeweiligen regulierten Gene sind gezeigt.

Eine genauere Betrachtung der durch Fur regulierten Gene zeigt, dass keines dieser Gene in direktem Zusammenhang mit der Aufnahme, dem Transport oder dem Einbau von Eisen steht (Tabelle 19). Jedoch wurden einige Gene identifiziert die an der Bakteriochlorophyll Biosynthese (*bchL* und *bchD*) und dem Photosyntheseapparats (*puhA*, *puhB* und *puhC*) beteiligt waren (Tabelle 19). Deren Genexpression wurde ausschließlich durch *apo*-Fur in Abwesenheit von Eisen aktiviert.

Einzigste Ausnahme ist die Regulation des Gens *Dshi_1660*, welches für den *RirA* Regulator in *D. shibae* codiert. Unter Eisenmangel kommt es zu einer Aktivierung der Genexpression von *Dshi_1660* durch *Fur*, was zu einer erhöhten Expression des *RirA* Regulators in der Zelle führt.

[A]

Fur^α-Box

[B]

```

CCGGAGGCCACACTGAGCGCTTCGAGCGTATCGCGAGAGGGGTTCGACATGGCGATCAACA
CGACGTCCGGTCCCAGTTCCGCCATGTGCCGCGCAAGCCCTGTCGCAGACCCGAGCACCAT
CACTTCCGCCTCGCCAGCTTCCGCAAGGCCATCCATGATCATCCGCGCACGGGATTCATCA
GGCTCTACCACGAGTATCTTGAGGGGGCTTCGGCATGCCGAAGCTGTTTGGGCTTTCCGAGG
GACTCGCAAGGGTTCGCGCGCGTTGCGCCTGCGCGGTGTTACGGTCTGCTCAGATTTTGGG
CGTTACCAAATGCTTCGTGCCACTCACCGGGGCATTCTATTCGACGCTGTCGGCCGGGCTT
GCCGGGCTGCTCGTGTGCTTGTGGGGTGCAGTCGCCTTGGATTCTTCTGCTTGATCCAAA
TCAAAGACACCTCTTAGACTATCCTTAACGTGGACGTGACTGCGTCCTCGCCCCGAAAAG
GATCTTAGGTCCATG

```

Abb. 72: Sequenzmotiv der potentiellen Fur Bindestelle im Promotorbereich des *rirA* Gens. A: Das Sequenzmotiv 5'-TGA-N₉-GCA-3' als potentielle Fur Bindestelle wie es bioinformatisch in verschiedenen Alphaproteobakterien gefunden wurde (Rodionov *et al.*, 2006). B: Promotorbereich des *rirA* Gens mit einer Länge von 500 bp. Das Startcodon ist blau hervorgehoben und die potentielle Fur Bindestelle grün markiert.

In Alphaproteobakterien wurde bioinformatisch ein Sequenzmotiv für eine potentielle Fur Bindestelle die sogenannte Fur-Box identifiziert (Abb. 72, A) (Rodionov *et al.*, 2006). Eine Betrachtung der Promotorsequenz des *rirA* Gens zeigte, dass eine leicht abgewandelte Fur Bindestelle mit dem Sequenzmotiv 5'-TGC-N₉-GCA-3' zu finden war (Abb. 72, B). Diese Fur-Box ist ein weiterer Hinweis für die Regulation von Fur für das *rirA* Gen. Diese direkte Regulation von *Dshi_1660* durch *Fur* hat zur Folge, dass alle durch *RirA* regulierten Gene, indirekt auch durch *Fur* reguliert werden.

Tabelle 19: Fur Regulon. Die angegebenen Werte entsprechen dem log2 FC

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe/ WT-Fe	WT+Fe/ Δfur +Fe	WT+Fe/ Δfur -Fe	WT-Fe/ Δfur +Fe	WT-Fe/ Δfur -Fe	Δfur +Fe/ Δfur -Fe
holo-Fur Repressor								
Dshi_2676	histidine kinase		1,01	1,12	0,86	0,14	-0,27	-0,19
Dshi_2189	bifunctional 2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase	<i>cpdB</i>	1,70	1,59	1,77	-0,13	0,39	0,43
Dshi_3684	hypothetical protein		2,35	0,88	1,25	-1,52	-1,10	0,29
Dshi_0244	alanine dehydrogenase	<i>adh</i>	3,25	1,17	1,61	-2,91	-2,34	0,28
holo-Fur Aktivator								
Dshi_0484	YVTN beta-propeller repeat-containing protein		-0,85	-1,12	-1,36	-0,37	-0,50	-0,24
Dshi_0486	hypothetical protein		-1,47	-1,66	-1,48	-0,29	-0,11	0,23
Dshi_0490	hypothetical protein		-0,90	-1,13	-1,25	-0,27	0,10	-0,07
Dshi_0598	short-chain dehydrogenase/reductase SDR		-1,74	-0,96	-1,51	0,59	0,69	-0,08
Dshi_0599	deoxyribodipyrimidine photolyase-related protein		-2,18	-1,60	-1,92	0,31	0,32	-0,10
Dshi_1479	exopolysaccharide synthesis ExoD		-1,29	-1,11	-0,84	0,31	0,44	0,19
Dshi_1772	hypothetical protein		-1,57	-1,02	-1,05	0,33	0,19	-0,05
Dshi_1791	lysine exporter protein LysE/YggA		-0,97	-0,95	-1,09	-0,05	-0,17	-0,12
Dshi_2195	entericidin Ec-nAB		-2,04	-1,82	-1,98	0,15	0,04	-0,10
Dshi_3611	DtxR family iron dependent repressor		-0,91	-0,83	-1,41	-0,25	-0,57	-0,33
Dshi_3842	hypothetical protein		-1,20	-0,83	-1,32	0,27	-0,12	-0,28
Dshi_3900	short-chain dehydrogenase/reductase SDR		-0,89	-0,82	-1,24	0,11	-0,08	-0,26
Dshi_3927	hypothetical protein		-1,05	-0,93	-1,06	0,46	0,15	-0,19
Dshi_3928	homocysteine S-methyltransferase		-1,51	-0,90	-1,05	0,68	0,45	-0,13
apo Fur Aktivator								
Dshi_0045	UspA domain-containing protein		0,82	-0,14	-0,06	-1,31	-1,02	0,10
Dshi_0143	nitrogen regulatory protein P-II	<i>glnK</i>	3,08	-0,08	-0,28	-3,66	-3,14	-0,04
Dshi_0144	ammonium transporter	<i>amtB</i>	3,10	-0,31	-0,15	-3,58	-3,82	-0,14
Dshi_0257	peptidase S8 and S53 subtilisin kexin sedolisin		1,05	-0,38	-0,37	-1,30	-1,43	-0,01
Dshi_0267	hypothetical protein		1,20	-0,41	-0,24	-1,64	-1,30	0,15

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe/ WT-Fe	WT+Fe/ Δfur +Fe	WT+Fe/ Δfur -Fe	WT-Fe/ Δfur +Fe	WT-Fe/ Δfur -Fe	Δfur +Fe / Δfur -Fe
<i>Dshi_0487</i>	hypothetical protein		1,98	-0,77	-0,78	-2,83	-2,80	0,00
<i>Dshi_0488</i>	hypothetical protein		1,85	-0,68	-0,71	-2,76	-2,63	0,04
<i>Dshi_0685</i>	ApbE family lipoprotein	<i>apbE</i>	1,37	-0,15	-0,53	-1,52	-1,37	-0,35
<i>Dshi_0687</i>	binding-protein-dependent transport systems inner membrane component		0,99	0,06	0,38	-1,42	-1,15	0,01
<i>Dshi_0739</i>	Ppx/GppA phosphatase		1,02	-0,49	-0,16	-1,55	-1,13	0,32
<i>Dshi_0746</i>	MIP family channel protein	<i>aqpZ</i>	1,27	-0,50	-0,18	-1,91	-1,47	0,39
<i>Dshi_0870</i>	SARP family transcriptional regulator		1,01	0,25	0,25	-1,05	-1,03	0,20
<i>Dshi_0878</i>	hypothetical protein		1,40	-0,73	-0,67	-2,13	-2,05	0,05
<i>Dshi_0894</i>	peptidoglycan binding domain-containing protein		1,18	-0,18	0,07	-1,30	-1,17	0,18
<i>Dshi_0899</i>	hypothetical protein		0,84	0,01	0,27	-1,21	-0,92	0,19
<i>Dshi_0903</i>	hypothetical protein		0,89	-0,49	-0,15	-1,48	-1,16	0,37
<i>Dshi_0945</i>	peptidoglycan binding domain-containing protein		1,13	0,21	0,06	-0,95	-1,15	-0,11
<i>Dshi_1038</i>	Asp/Glu racemase		0,99	-0,34	0,02	-1,48	-1,45	0,39
<i>Dshi_1041</i>	TRAP dicarboxylate transporter, DctM subunit		0,83	-0,04	-0,04	-0,92	-1,01	0,44
<i>Dshi_1042</i>	tripartite ATP-independent periplasmic transporter DctQ		1,05	-0,42	-0,14	-1,57	-1,28	0,31
<i>Dshi_1043</i>	TRAP dicarboxylate transporter-DctP subunit		1,69	-0,46	-0,12	-2,21	-1,80	0,19
<i>Dshi_1048</i>	enoyl-CoA hydratase/isomerase		0,86	-0,18	-0,38	-1,02	-1,31	-0,12
<i>Dshi_1049</i>	short chain dehydrogenase		1,01	-0,14	-0,20	-1,26	-1,30	0,05
<i>Dshi_1051</i>	MmgE/PrpD family protein		0,85	-0,33	-0,45	-1,71	-1,74	0,14
<i>Dshi_1281</i>	respiratory-chain NADH dehydrogenase domain-containing protein	<i>fdhB</i>	1,32	-0,55	-0,40	-1,88	-1,71	0,06
<i>Dshi_1282</i>	formate dehydrogenase, alpha subunit	<i>fdhA</i>	1,08	-0,39	-0,45	-1,50	-1,55	-0,07
<i>Dshi_1306</i>	hypothetical protein		1,83	-0,67	-0,25	-2,57	-2,02	0,50
<i>Dshi_1384</i>	permease protein of ABC transporter		1,13	-0,41	-0,33	-1,63	-1,48	0,12
<i>Dshi_1413</i>	extracellular solute-binding protein		0,80	-0,36	-0,39	-1,29	-1,08	0,20

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe/ WT-Fe	WT+Fe/ Δfur +Fe	WT+Fe/ Δfur -Fe	WT-Fe/ Δfur +Fe	WT-Fe/ Δfur -Fe	Δfur +Fe / Δfur -Fe
Dshi_1414	binding-protein-dependent transport systems inner membrane component		0,81	-0,50	-0,46	-1,38	-1,36	0,02
Dshi_1441	hypothetical protein		0,96	-0,42	-0,30	-1,38	-1,27	0,13
Dshi_1442	peroxidase		1,10	-0,40	-0,27	-1,70	-1,49	0,14
Dshi_1477	Usg family protein		1,97	0,53	0,72	-1,53	-1,47	-0,11
Dshi_1525	AraC family transcriptional regulator		0,94	-0,43	-0,24	-1,46	-1,41	0,31
Dshi_1583	lipoyl synthase	<i>lipA</i>	2,16	-0,11	-0,11	-2,17	-2,24	0,00
Dshi_1654	Beta-glucosidase	<i>bglA</i>	1,04	-0,07	-0,09	-1,21	-1,02	-0,10
Dshi_1660	BadM/Rrf2 family transcriptional regulator		1,18	-0,04	0,01	-1,25	-1,39	-0,03
Dshi_1687	HNH endonuclease		1,59	-0,47	-0,25	-1,85	-1,83	0,22
Dshi_1739	hypothetical protein		0,93	-0,18	-0,48	-1,25	-1,40	-0,28
Dshi_1749	carboxylate-amine ligase		0,89	-0,05	-0,02	-1,12	-0,96	0,20
Dshi_1807	UspA domain-containing protein		1,41	-0,56	-0,30	-2,03	-1,75	0,27
Dshi_1808	amino acid carrier protein		1,43	-0,38	-0,25	-1,97	-1,70	0,46
Dshi_1819	LuxR family transcriptional regulator		0,96	-0,01	0,16	-1,02	-0,93	0,17
Dshi_1838	nitrogen regulatory protein P-II		1,21	-0,16	-0,63	-1,48	-1,75	-0,45
Dshi_1839	glutamine synthetase, type I	<i>glnA</i>	1,06	-0,15	-0,39	-1,21	-1,37	-0,24
Dshi_1843	hypothetical protein		1,40	-0,16	0,18	-1,41	-1,11	0,31
Dshi_1861	hypothetical protein		0,88	-0,29	-0,38	-1,22	-1,30	0,13
Dshi_1862	pentapeptide repeat-containing protein		1,16	-0,01	-0,04	-1,27	-1,21	0,05
Dshi_1966	dihydrolipoamide dehydrogenase	<i>lpdA</i>	1,38	-0,27	0,16	-1,72	-1,12	0,54
Dshi_1967	dehydrogenase catalytic domain-containing protein	<i>aceF</i>	1,41	0,02	0,21	-1,30	-1,10	0,27
Dshi_1968	pyruvate dehydrogenase subunit E1	<i>aceE</i>	1,51	-0,21	-0,05	-1,69	-1,54	0,40
Dshi_2042	aminotransferase class-III	<i>tpa</i>	1,38	-0,08	0,38	-1,51	-1,26	0,28
Dshi_2068	5'-methylthioadenosine phosphorylase		0,93	-0,32	-0,43	-1,21	-1,50	-0,04
Dshi_2081	cytochrome c class I		1,61	0,08	0,27	-1,85	-1,53	0,29
Dshi_2102	DNA methylase N-4/N-6 domain-containing protein		1,60	-0,25	0,38	-1,47	-1,27	0,58
Dshi_2225	glutamine amidotransferase class-I		0,82	-0,50	-0,38	-1,41	-1,26	0,15

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe/ WT-Fe	WT+Fe/ Δfur +Fe	WT+Fe/ Δfur -Fe	WT-Fe/ Δfur +Fe	WT-Fe/ Δfur -Fe	Δfur +Fe / Δfur -Fe
<i>Dshi_2303</i>	NnrS family protein		1,08	0,38	0,78	-1,38	-0,96	0,50
<i>Dshi_2304</i>	hemerythrin HHE cation binding domain-containing protein		1,77	0,07	0,48	-1,79	-1,34	0,45
<i>Dshi_2306</i>	BadM/Rrf2 family transcriptional regulator		0,85	-0,24	-0,05	-1,19	-1,03	0,14
<i>Dshi_2327</i>	hypothetical protein		1,42	-0,30	-0,23	-1,83	-1,67	0,14
<i>Dshi_2360</i>	urease accessory protein UreG		1,07	-0,17	-0,08	-1,40	-1,33	-0,20
<i>Dshi_2361</i>	carboxymuconolactone decarboxylase		1,57	-0,35	-0,01	-2,15	-2,52	0,21
<i>Dshi_2362</i>	urease accessory protein UreF		1,26	-0,26	0,13	-1,35	-1,32	0,44
<i>Dshi_2363</i>	UreE urease accessory domain-containing protein	<i>ureE</i>	1,54	-0,27	0,27	-1,39	-1,02	0,54
<i>Dshi_2364</i>	hypothetical protein		3,35	0,11	0,64	-3,25	-2,68	0,54
<i>Dshi_2365</i>	urease subunit alpha	<i>ureC</i>	1,93	-0,19	-0,17	-2,12	-2,26	0,08
<i>Dshi_2367</i>	alginate regulatory protein AlgP		1,28	-0,17	-0,19	-1,50	-1,31	-0,08
<i>Dshi_2453</i>	hypothetical protein		0,87	0,12	0,44	-1,47	-1,22	0,47
<i>Dshi_2454</i>	hypothetical protein		1,23	-0,43	-0,29	-1,82	-1,68	0,36
<i>Dshi_2562</i>	hypothetical protein		1,13	-0,43	-0,06	-1,59	-1,26	0,29
<i>Dshi_2563</i>	phage tail protein		2,28	-0,18	-0,42	-2,33	-2,80	-0,23
<i>Dshi_2564</i>	tail sheath protein		1,98	0,28	0,10	-1,61	-1,70	-0,09
<i>Dshi_2565</i>	two component LuxR family transcriptional regulator		1,03	-0,23	-0,47	-1,16	-1,40	-0,24
<i>Dshi_2642</i>	hypothetical protein		0,85	-0,27	-0,12	-1,32	-0,99	0,31
<i>Dshi_2695</i>	putative ureashort-chain amide or branched-chain amino acid uptake ABC transporter periplasmic solute-binding protein precursor		2,88	-0,05	-0,74	-3,11	-3,70	-0,50
<i>Dshi_2696</i>	inner-membrane translocator		1,66	-0,02	-0,34	-1,69	-2,13	0,00
<i>Dshi_2697</i>	inner-membrane translocator		1,05	-0,04	-0,11	-1,31	-1,66	-0,02
<i>Dshi_2763</i>	hemolysin-type calcium-binding region		2,12	-0,46	-0,24	-2,55	-2,27	0,17
<i>Dshi_2808</i>	thioredoxin SoxW		0,83	-0,04	-0,39	-0,95	-1,24	-0,36
<i>Dshi_2878</i>	succinyl-CoA synthetase subunit beta	<i>sucC</i>	1,79	0,17	0,08	-1,51	-1,65	-0,07
<i>Dshi_2879</i>	hypothetical protein		1,52	-0,11	-0,34	-1,90	-1,84	0,04

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe/ WT-Fe	WT+Fe/ Δfur +Fe	WT+Fe/ Δfur -Fe	WT-Fe/ Δfur +Fe	WT-Fe/ Δfur -Fe	Δfur +Fe/ Δfur -Fe
Dshi_2880	hypothetical protein		1,43	-0,14	-0,52	-1,59	-2,13	-0,37
Dshi_2881	hypothetical protein		1,62	0,25	0,03	-1,39	-1,53	-0,28
Dshi_2882	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	<i>sucD</i>	1,76	0,21	0,11	-1,50	-1,55	-0,09
Dshi_2883	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	<i>sucA</i>	1,67	0,12	-0,14	-1,38	-1,88	-0,51
Dshi_2884	dihydrolipoamide succinyltransferase	<i>sucB</i>	1,81	0,25	0,07	-1,45	-1,71	-0,17
Dshi_2885	inner membrane protein		1,60	-0,26	-0,47	-1,70	-2,12	-0,15
Dshi_2886	dihydrolipoamide dehydrogenase	<i>lpd</i>	2,17	0,14	-0,07	-2,02	-2,13	-0,03
Dshi_3152	hypothetical protein		3,12	-0,08	0,29	-3,29	-2,89	0,39
Dshi_3153	TRAP dicarboxylate transporter-DctP subunit		3,22	-0,13	-0,01	-3,60	-3,18	0,12
Dshi_3154	TRAP transporter, transmembrane protein, putative		3,41	-0,07	-0,09	-3,39	-3,19	0,09
Dshi_3155	TRAP dicarboxylate transporter, DctM subunit		2,54	-0,20	-0,09	-2,88	-2,73	0,11
Dshi_3156	hypothetical protein		2,90	-0,19	-0,40	-3,21	-3,44	-0,17
Dshi_3169	cytochrome c class I	<i>cycA</i>	1,46	0,41	0,72	-1,17	-1,05	0,13
Dshi_3502	magnesium chelatase subunit I	<i>bchI</i>	0,95	0,01	0,01	-1,00	-0,96	0,05
Dshi_3503	magnesium chelatase subunit D	<i>bchD</i>	0,93	0,01	0,05	-1,02	-0,95	0,09
Dshi_3508	zeta-phytoene desaturase	<i>crtI</i>	0,86	-0,03	-0,02	-0,87	-0,91	-0,02
Dshi_3514	polyprenyl synthetase	<i>crtE</i>	1,00	-0,39	-0,30	-1,37	-1,18	0,22
Dshi_3515	O-methyltransferase family protein	<i>crtF</i>	0,87	-0,36	-0,25	-1,32	-1,15	0,13
Dshi_3528	geranylgeranyl reductase	<i>bchP</i>	0,90	-0,30	-0,23	-1,21	-1,11	0,09
Dshi_3540	photosynthetic reaction center subunit H	<i>puhA</i>	1,08	-0,54	-0,41	-1,62	-1,42	0,22
Dshi_3541	photosynthetic complex assembly protein	<i>puhB</i>	0,98	-0,49	-0,30	-1,43	-1,17	0,21
Dshi_3542	hypothetical protein	<i>puhC</i>	0,80	-0,28	-0,12	-1,08	-0,93	0,19
Dshi_3543	hypothetical protein		0,82	-0,24	-0,24	-1,11	-1,01	0,06
Dshi_3544	magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase	<i>acsF</i>	0,89	-0,17	0,02	-1,03	-0,80	0,18
Dshi_3545	hypothetical protein	<i>puhE</i>	1,18	-0,03	-0,06	-1,49	-1,30	0,17
Dshi_3595	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein		1,09	-0,59	-0,26	-1,78	-1,51	0,29

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe/ WT-Fe	WT+Fe/ Δfur +Fe	WT+Fe/ Δfur -Fe	WT-Fe/ Δfur +Fe	WT-Fe/ Δfur -Fe	Δfur +Fe / Δfur -Fe
<i>Dshi_3686</i>	ABC transporter related		1,38	0,63	0,80	-1,14	-0,98	0,16
<i>Dshi_3687</i>	cobalt transport protein		1,16	0,12	0,42	-1,06	-0,87	0,35
<i>Dshi_3702</i>	fatty acid hydroxylase		1,00	-0,05	-0,08	-1,19	-1,49	-0,03
<i>Dshi_3756</i>	hypothetical protein		0,90	-0,53	-0,62	-1,53	-1,46	-0,10
<i>Dshi_3877</i>	thiamine biosynthesis protein ThiC	<i>thiC</i>	2,32	0,36	0,51	-1,82	-1,57	0,14
<i>Dshi_4155</i>	hypothetical protein		1,20	-0,16	-0,38	-1,47	-1,55	-0,23

4.7.4 Das Irr Regulon

In *D. shibae* werden 9 Gene in Abwesenheit von Eisen durch Irr reprimiert, bzw. in der Anwesenheit von Eisen kommt es zu einer De-Repression durch Irr (Abb. 73 und Tabelle 20, *apo*-Irr Repressor). Bei weiteren 33 Genen ist neben der *apo*-Irr Repression ein leichter Einfluss der anderen Regulatoren zu beobachten gewesen (Abb. 73 und Tabelle 20, *apo*-Irr Repressor + leichter Einfluss der anderen Regulatoren). Darüber hinaus wurden 47 Gene durch *apo*-Irr aktiviert (Abb. 73 und Tabelle 20, *apo*-Irr Aktivator).

Im Wildtypstamm wurden unter Eisenmangel deutlich geringere Transkriptmengen für Irr reprimierte Gene detektiert als in Anwesenheit von Eisen. Daraus ergaben sich log₂ FC Werte von ca. -1 (Tabelle 20, WT+Fe/WT-Fe). Im Δirr Mutantenstamm war das Transkriptlevel in etwa so hoch wie im Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen. Es ergaben sich log₂ FC Werte um 0 (Tabelle 20, WT+Fe/ Δirr +Fe und WT+Fe/ Δirr -Fe). In Anwesenheit von Eisen kann der Irr Regulator ein Häm binden und wird degradiert, sodass es zu einer De-Repression der Genexpression kam. Im Δirr Mutantenstamm fehlt der Irr Regulator vollständig und es findet ebenfalls keine Repression statt. Unter Eisenmangel ist die Transkriptmenge im Wildtypstamm deutlich geringer als in dem Δirr Mutantenstamm, sodass log₂ FC Werte von ca. 1 bis 2 zu beobachten waren (Tabelle 20, WT-Fe/ Δirr +Fe und WT-Fe/ Δirr -Fe). Bei den Genen, bei denen eine alleinige Repression durch Irr stattgefunden hatte, war die Transkriptmenge im Δirr Mutantenstamm sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Eisen ähnlich. Es ergab sich ein log₂ FC von ca. 0 (Tabelle 20, Δirr +Fe/ Δirr -Fe). Die Gene, die zusätzlich einen Einfluss auf die Genexpression durch andere Regulatoren zeigten, war die Transkriptmenge in Abwesenheit deutlich geringer als in Anwesenheit von Eisen. Hieraus ergaben sich log₂ FC Werte von ca. -1 (Tabelle 20, Δirr +Fe/ Δirr -Fe). Eine mögliche Erklärung für das erhöhte Transkriptlevel in Anwesenheit von Eisen, wäre die aktivierende Funktion eines weiteren Regulators.

Nahezu alle Gene, die durch *apo*-Irr reguliert werden, codieren für ribosomale Proteine. Die DNA Array Daten lieferten auch Hinweise darauf, dass *apo*-Irr als Aktivator unter Eisenmangel fungieren kann. Durch diese Art der *apo*-Irr Aktivierung werden in *D. shibae* 47 Gene reguliert (Tabelle 20, *apo*-Irr Aktivator). Unter anderem handelt es sich hierbei um die Gene *Dshi_0686*, welches für NosR codiert, *Dshi_1653*, welches für

einen „LacI family transcription regulator“ codiert und *Dshi_3687*, welches für einen Kobalt Transporter codiert. Im Wildtypstamm werden in Anwesenheit von Eisen geringere Transkriptlevel als unter Eisenmangel erreicht. Dies ergab log₂ FC Werte um 1 (Tabelle 20, WT+Fe/WT-Fe). In Anwesenheit von Eisen waren die Transkriptmengen im Wildtypstamm vergleichbar mit den Transkriptmengen im Δirr Mutantenstamm. Dies wurde durch log₂ FC Werte von ca. 0 deutlich (Tabelle 20, WT+Fe/ Δirr +Fe, WT+Fe/ Δirr -Fe). Jedoch wurden in Abwesenheit von Eisen höhere Transkriptmengen im Wildtypstamm beobachtet im Vergleich zum Δirr Mutantenstamm. Es ergaben sich log₂ FC Werte um -1 (Tabelle 20, WT-Fe/ Δirr +Fe). In Abwesenheit von Eisen kam es im Wildtypstamm zu einer Aktivierung der Genexpression durch *apo-Irr*, die im Δirr Mutantenstamm in Anwesenheit von Eisen fehlt. Ein Vergleich der Transkriptmengen im Wildtypstamm mit dem Δirr Mutantenstamm in Abwesenheit von Eisen, zeigten ähnliche Transkriptmengen durch log₂ FC Werte um 0 (Tabelle 20, WT-Fe/ Δirr -Fe). Dies ist auch der Fall, wenn die Transkriptmengen im Δirr Mutantenstamm in An- und Abwesenheit von Eisen betrachtet wurden (Tabelle 20, Δirr +Fe/ Δirr -Fe). Interessanterweise deuten die gleichen Transkriptmengen im Wildtypstamm und im Δirr Mutantenstamm in Abwesenheit von Eisen darauf hin, dass ein weiterer Regulator die Genexpression im Δirr Mutantenstamm aktivieren müsste. Allerdings ist dieser Einfluss bei einem Vergleich der Transkriptmengen im Δirr Mutantenstamm in An- und Abwesenheit von Eisen nicht zu beobachten. Eventuell entstehen durch den fehlenden Irr Regulator im Δirr Mutantenstamm unter Eisenmangel sekundäre Effekte, die die Genexpression beeinflussen.

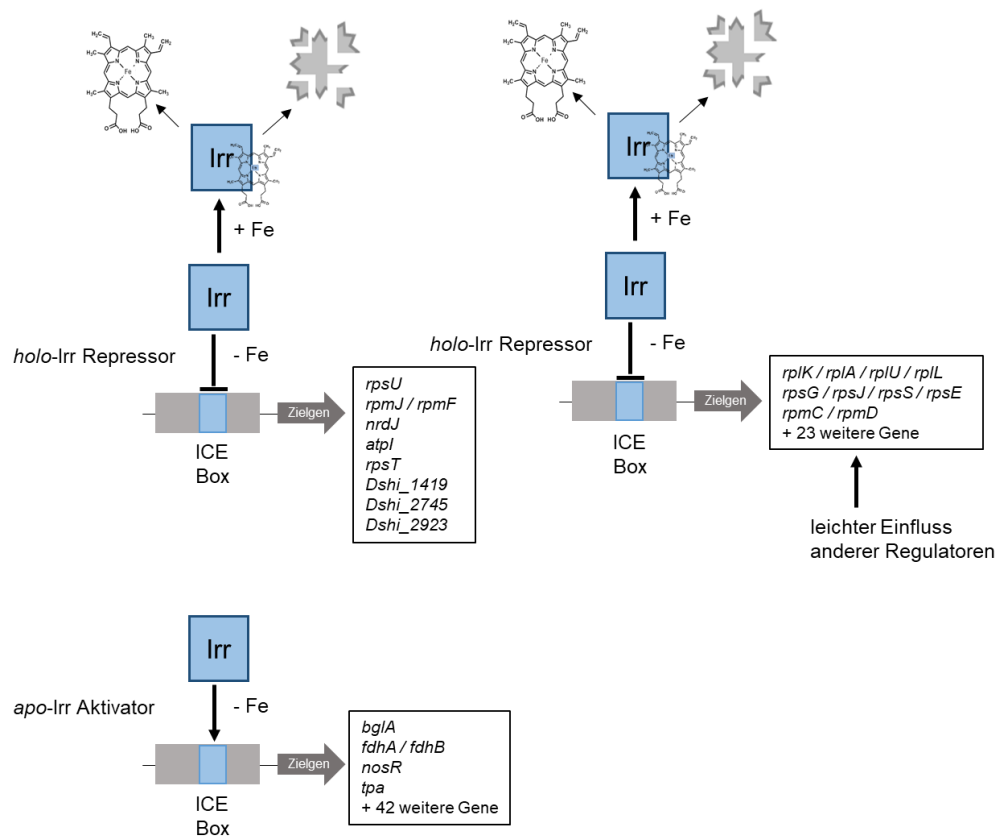


Abb. 73: Schematische Darstellung des Irr Regulons. Die drei beobachteten Mechanismen der Irr-Regulation mit den jeweiligen regulierten Gene sind gezeigt.

Die Analyse der einzelnen Regulons zeigte, dass die Regulatoren Fur, RirA und Irr an der Regulation vieler verschiedener Stoffwechselwege in der Zelle beteiligt sind. Zusätzlich konnte auch eine direkte Interaktion von Fur mit dem Gen *Dshi_1660*, welches für den RirA Regulator codiert, beobachtet werden. Der einzige Einfluss auf Gene des Eisenmetabolismus war in den Transkriptomdaten des *ΔiscR* Mutantenstamms zu finden. Dies lässt vermuten, dass IscR einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation dieser Gene hat. Außerdem lassen die verschiedenen Formen der Regulation, die für die einzelnen Regulatoren Fur, RirA, Irr und IscR beobachtet werden konnten, eine komplexe Form der Regulation vermuten.

Tabelle 20: Irr Regulon. Die angegebenen Werte entsprechen dem log2 FC

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe/ WT-Fe	WT+Fe/ Δirr +Fe	WT+Fe/ Δirr -Fe	WT-Fe/ Δirr +Fe	WT-Fe/ Δirr -Fe	Δirr +Fe/ Δirr -Fe
apo Irr Repressor								
Dshi_0246	30S ribosomal protein S21	<i>rpsU</i>	-1,32	0,76	0,03	1,87	1,26	-0,76
Dshi_0387	50S ribosomal protein L36	<i>rpmJ</i>	-1,42	0,11	-0,30	1,45	0,98	-0,39
Dshi_1419	hypothetical protein		-1,15	0,30	-0,43	1,49	0,80	-0,70
Dshi_1718	50S ribosomal protein L32	<i>rpmF</i>	-0,89	0,55	0,07	1,37	0,85	-0,45
Dshi_1785	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	<i>nrdJ</i>	-0,90	0,72	0,01	1,54	0,88	-0,66
Dshi_2745	PhzF family phenazine biosynthesis protein		-0,91	0,78	0,15	1,24	0,89	-0,58
Dshi_2923	5TM Receptors of the LytS-YhcK type transmembrane region		-1,33	0,23	0,28	1,63	1,44	0,14
Dshi_3031	ATP synthase F0, subunit I	<i>atpI</i>	-1,26	0,25	-0,30	1,39	0,88	-0,66
Dshi_3371	30S ribosomal protein S20	<i>rpsT</i>	-1,70	0,46	-0,34	1,92	1,14	-0,64
apo Irr Repressor + Einfluss der anderen								
Dshi_0260	50S ribosomal protein L11	<i>rplK</i>	-1,65	0,59	-0,47	2,06	0,96	-0,99
Dshi_0261	50S ribosomal protein L1	<i>rplA</i>	-1,53	0,45	-0,59	1,90	0,81	-0,95
Dshi_0265	50S ribosomal protein L10	<i>rplJ</i>	-2,04	0,45	-0,66	2,21	1,33	-1,15
Dshi_0266	50S ribosomal protein L7/L12	<i>rplL</i>	-2,01	0,58	-0,54	2,30	1,14	-1,09
Dshi_0272	30S ribosomal protein S7	<i>rpsG</i>	-1,34	0,63	-0,39	1,86	0,84	-0,94
Dshi_0273	elongation factor G	<i>fusA</i>	-1,35	0,73	-0,33	1,98	0,96	-0,89
Dshi_0275	30S ribosomal protein S10	<i>rpsJ</i>	-1,62	0,79	-0,45	2,23	1,02	-1,10
Dshi_0276	ribosomal protein L3	<i>rplC</i>	-1,76	0,70	-0,61	2,24	0,90	-1,15
Dshi_0278	50S ribosomal protein L23	<i>rplW</i>	-1,63	0,72	-0,70	2,24	0,86	-1,21
Dshi_0286	30S ribosomal protein S19	<i>rpsS</i>	-1,63	0,69	-0,41	2,12	1,08	-0,94
Dshi_0287	50S ribosomal protein L22	<i>rplV</i>	-1,66	0,70	-0,48	2,16	1,00	-1,01
Dshi_0289	50S ribosomal protein L16	<i>rplP</i>	-1,65	0,58	-0,56	2,10	1,03	-0,98
Dshi_0293	50S ribosomal protein L29	<i>rpmC</i>	-1,48	0,51	-0,36	1,90	0,86	-0,85
Dshi_0295	50S ribosomal protein L14	<i>rplN</i>	-1,62	0,48	-0,76	2,08	0,89	-1,07
Dshi_0298	30S ribosomal protein S14	<i>rpsN</i>	-1,60	0,79	-0,28	2,02	1,19	-1,01
Dshi_0299	30S ribosomal protein S8	<i>rpsH</i>	-1,68	0,76	-0,39	2,22	1,06	-1,00
Dshi_0300	50S ribosomal protein L6	<i>rplF</i>	-1,57	0,69	-0,45	2,05	0,93	-1,05
Dshi_0302	30S ribosomal protein S5	<i>rpsE</i>	-1,55	0,78	-0,39	2,26	1,07	-1,05

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe/ WT-Fe	WT+Fe/ Δ irr+Fe	WT+Fe/ Δ irr-Fe	WT-Fe/ Δ irr+Fe	WT-Fe/ Δ irr-Fe	Δ irr+Fe/ Δ irr-Fe
Dshi_0303	50S ribosomal protein L30	<i>rpmD</i>	-1,66	0,78	-0,43	2,27	1,05	-1,11
Dshi_0304	50S ribosomal protein L15	<i>rplO</i>	-1,56	0,66	-0,46	2,10	0,95	-1,04
Dshi_0308	30S ribosomal protein S11	<i>rpsK</i>	-1,09	0,78	-0,17	1,65	0,80	-0,84
Dshi_0347	cob(II)yrinic acid a,c-diamide reductase	<i>bluB</i>	-1,65	0,42	-0,49	2,05	0,97	-0,88
Dshi_0348	30S ribosomal protein S16	<i>rpsP</i>	-1,78	0,59	-0,43	2,13	0,84	-1,01
Dshi_0654	cytochrome c class I	<i>cycM</i>	-1,95	0,58	-0,77	2,31	0,97	-1,36
Dshi_0950	50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc	<i>rplY</i>	-1,73	0,49	-0,68	2,11	0,90	-1,03
Dshi_1350	nucleoside diphosphate kinase	<i>ndk</i>	-1,85	0,44	-0,74	2,18	0,95	-1,10
Dshi_1548	30S ribosomal protein S2	<i>rpsB</i>	-1,84	0,56	-0,59	2,13	0,98	-1,02
Dshi_1601	30S ribosomal protein S9	<i>rpsI</i>	-1,85	0,56	-0,68	2,29	0,96	-1,15
Dshi_1602	50S ribosomal protein L13	<i>rplM</i>	-1,82	0,65	-0,72	2,30	0,95	-1,20
Dshi_2186	30S ribosomal protein S6	<i>rpsF</i>	-1,44	0,59	-0,35	1,99	0,93	-0,93
Dshi_2187	30S ribosomal protein S18	<i>rpsR</i>	-1,71	0,60	-0,50	2,19	1,10	-0,89
Dshi_2188	50S ribosomal protein L9	<i>rplI</i>	-1,70	0,65	-0,46	2,28	1,10	-1,10
Dshi_2876	malate dehydrogenase	<i>mdh</i>	-1,21	0,79	-0,22	1,94	0,87	-1,00
Dshi_2994	30S ribosomal protein S15	<i>rpsO</i>	-1,66	0,73	-0,48	2,25	1,03	-1,03
apo-Irr Aktivator								
Dshi_0045	UspA domain-containing protein		0,82	0,04	0,30	-0,83	-0,33	0,34
Dshi_0257	peptidase S8 and S53 subtilisin kexin sedolisin		1,05	-0,15	0,54	-1,05	-0,22	0,68
Dshi_0267	hypothetical protein		1,20	-0,13	0,55	-1,19	-0,36	0,66
Dshi_0400	CRISPR-associated endonuclease CsnI family protein		0,95	0,16	0,45	-0,90	-0,14	0,43
Dshi_0401	CRISPR-associated CasI family protein		1,20	0,28	0,62	-0,95	-0,35	0,35
Dshi_0686	regulatory protein, putative	<i>nosR</i>	1,09	-0,37	-0,15	-1,55	-0,54	0,09
Dshi_0687	binding-protein-dependent transport systems inner membrane component		0,99	0,24	0,21	-1,30	-0,72	0,04
Dshi_0739	Ppx/GppA phosphatase		1,02	-0,14	0,75	-0,90	-0,10	0,78
Dshi_0903	hypothetical protein		0,89	-0,13	0,47	-1,12	-0,22	0,54
Dshi_0945	peptidoglycan binding domain-containing protein		1,13	0,05	0,73	-1,16	-0,12	0,48

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe/ WT-Fe	WT+Fe/ Δirr +Fe	WT+Fe/ Δirr -Fe	WT-Fe/ Δirr +Fe	WT-Fe/ Δirr -Fe	Δirr +Fe/ Δirr -Fe
<i>Dshi_1038</i>	Asp/Glu race- mase		0,99	0,13	0,08	-1,33	-0,68	0,33
<i>Dshi_1040</i>	aldehyde oxidase and xanthine de- hydrogenase mo- lybdopterin bind- ing		0,97	0,13	0,10	-0,94	-0,47	0,14
<i>Dshi_1041</i>	TRAP dicarbox- ylate transporter, DctM subunit		0,83	-0,07	0,10	-1,17	-0,46	0,31
<i>Dshi_1042</i>	tripartite ATP- independent periplasmic trans- porter DctQ		1,05	-0,48	0,02	-1,63	-0,75	0,50
<i>Dshi_1048</i>	enoyl-CoA hydra- tase/isomerase		0,86	0,01	0,09	-0,91	-0,39	0,10
<i>Dshi_1049</i>	short chain dehy- drogenase		1,01	-0,33	-0,04	-1,49	-0,73	0,14
<i>Dshi_1281</i>	respiratory-chain NADH dehydro- genase domain- containing protein	<i>fdhB</i>	1,32	-0,12	0,57	-1,45	-0,56	0,72
<i>Dshi_1282</i>	formate dehydro- genase, alpha subunit	<i>fdhA</i>	1,08	-0,34	0,26	-1,34	-0,73	0,48
<i>Dshi_1414</i>	binding-protein- dependent transport systems inner membrane component		0,81	0,00	0,38	-0,88	-0,29	0,43
<i>Dshi_1441</i>	hypothetical pro- tein		0,96	-0,06	0,65	-1,04	-0,02	0,77
<i>Dshi_1505</i>	hypothetical pro- tein		0,86	-0,78	0,00	-1,60	-0,69	0,66
<i>Dshi_1525</i>	AraC family tran- scriptional regula- tor		0,94	-0,34	0,13	-1,13	-0,33	0,50
<i>Dshi_1599</i>	binding-protein- dependent transport systems inner membrane component	<i>potB</i>	0,84	-0,07	0,63	-0,87	-0,02	0,69
<i>Dshi_1653</i>	LacI family tran- scription regula- tor		0,91	-0,31	0,46	-1,34	-0,20	0,71
<i>Dshi_1654</i>	Beta-glucosidase	<i>bglA</i>	1,04	-0,30	0,29	-1,17	-0,37	0,41
<i>Dshi_1739</i>	hypothetical pro- tein		0,93	-0,19	0,27	-1,18	-0,45	0,32
<i>Dshi_1748</i>	hypothetical pro- tein		0,85	-0,27	0,41	-1,03	-0,30	0,63
<i>Dshi_1808</i>	amino acid carrier protein		1,43	-0,05	0,60	-1,51	-0,54	0,69
<i>Dshi_1862</i>	pentapeptide re- peat-containing protein		1,16	0,22	0,73	-0,94	-0,22	0,67
<i>Dshi_2042</i>	aminotransferase class-III	<i>tpa</i>	1,38	0,27	0,21	-1,29	-0,57	0,62
<i>Dshi_2082</i>	L-sorbose de- hydrogenase, pu- tative		1,15	-0,28	0,29	-1,07	-0,62	0,41
<i>Dshi_2102</i>	DNA methylase N-4/N-6 domain- containing protein		1,60	0,63	0,21	-1,00	-0,22	0,13

Dshi_Nr.	Beschreibung	Gen	WT+Fe/ WT-Fe	WT+Fe/ Δ irr+Fe	WT+Fe/ Δ irr-Fe	WT-Fe/ Δ irr+Fe	WT-Fe/ Δ irr-Fe	Δ irr+Fe/ Δ irr-Fe
<i>Dshi_2225</i>	glutamine amidotransferase class-I		0,82	-0,16	0,21	-1,07	-0,43	0,45
<i>Dshi_2362</i>	urease accessory protein UreF		1,26	0,05	0,67	-1,06	-0,30	0,76
<i>Dshi_2452</i>	glycoside hydrolase family protein		0,87	-0,08	0,40	-0,92	-0,25	0,47
<i>Dshi_2453</i>	hypothetical protein		0,87	0,65	0,17	-0,86	-0,55	0,11
<i>Dshi_2454</i>	hypothetical protein		1,23	-0,22	-0,05	-1,57	-0,70	0,05
<i>Dshi_2456</i>	hypothetical protein		1,06	-0,06	0,23	-1,27	-0,68	0,14
<i>Dshi_2457</i>	hypothetical protein		1,07	-0,21	0,11	-1,55	-0,66	0,32
<i>Dshi_2565</i>	two component LuxR family transcriptional regulator		1,03	-0,45	0,17	-1,38	-0,48	0,48
<i>Dshi_2642</i>	hypothetical protein		0,85	-0,12	0,25	-0,99	-0,34	0,47
<i>Dshi_2808</i>	thioredoxin SoxW		0,83	0,08	0,21	-0,82	-0,40	0,19
<i>Dshi_2881</i>	hypothetical protein		1,62	0,77	0,41	-0,83	-0,75	-0,06
<i>Dshi_3654</i>	hypothetical protein		1,17	0,21	0,57	-0,84	-0,29	0,20
<i>Dshi_3687</i>	cobalt transport protein		1,16	-0,05	0,64	-1,28	-0,18	0,77
<i>Dshi_3702</i>	fatty acid hydroxylase		1,00	-0,31	0,22	-1,49	-0,41	0,45
<i>Dshi_3718</i>	AraC family transcriptional regulator		1,09	0,07	0,56	-0,88	-0,20	0,41
<i>Dshi_3756</i>	hypothetical protein		0,90	-0,67	0,16	-1,56	-0,67	0,64

4.7.5 Regulation des eisenabhängigen Genclusters in *D. shibae*

Die dem eisenabhängigen Gencluster zugehörigen Gene *irpA*, *exbB*, *fhuA*, *Dshi_0575* sowie ihre benachbarten Gene sind wie bereits gezeigt unter Eisenmangel stark induziert und an der Aufnahme von Eisen in *D. shibae* beteiligt. Die Betrachtung der Genexpression in Abhängigkeit der einzelnen Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR zeigt, dass die stärkste Regulation durch den IscR Regulator beobachtet wurde (Abb. 74). In der Heatmap Darstellung der Expressionsdaten signalisiert die Intensität der Grünfärbung die Stärke der Expression. Für den *D. shibae* Wildtypstamm war unter Eisenmangel eine Induktion der Genexpression des *irpA* Operons mit einem log2 FC von ca. 6 beobachtet worden. Unter identischen Bedingungen war unter Eisenmangel in den Mutantenstämmen Δfur , Δirr und $\Delta rirA$ eine ähnlich starke Expression zu beobachten. In dem $\Delta iscR$ Mutantenstamm hingegen nahm die Expressionsstärke deutlich ab mit einem log2 FC von 1,49. Bei den Genen des TonB Systems, die das zweite Operon des eisenabhängigen Genclusters bilden war zusätzlich auch ein Einfluss der Regulatoren Fur, Irr und RirA beobachtet worden. Die Genexpression der transkriptionellen Einheit des *fhuA* Gens nimmt sowohl in dem Δfur Mutantenstamm als auch in dem $\Delta iscR$ Mutantenstamm ab. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigte auch das *hmu* Operon. Die Genexpression nahm in den Mutantenstämmen Δfur und $\Delta iscR$ am stärksten ab verglichen zum *D. shibae* Wildtypstamm. Scheinbar werden die Transkriptionseinheiten im Zusammenspiel mehrerer Regulatoren reguliert. Daher ist eine genauere vergleichende Betrachtung der Genexpressionswerte nötig.

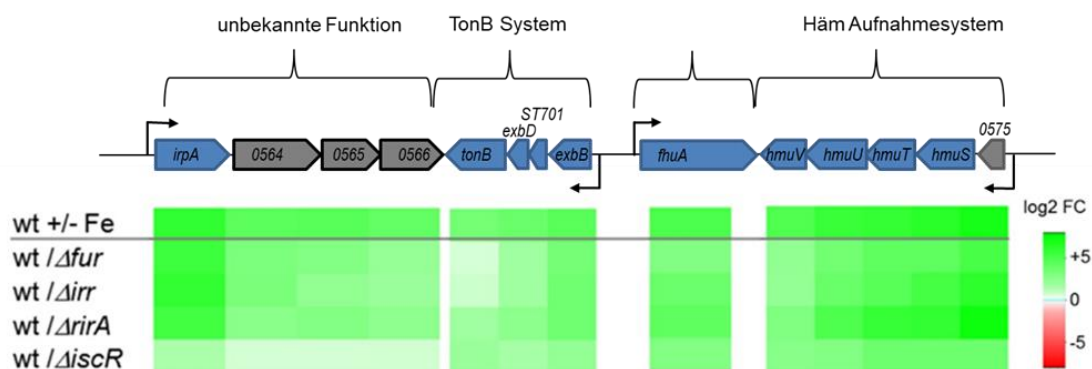


Abb. 74: Vergleich der Expressionsstärke der Gene des eisenabhängig regulierten Genclusters unter Eisenmangel in den einzelnen Regulatormutanten mit der Wildtypexpression.

Im Wildtypstamm wurde die Expression von *Dshi_0575* in Abwesenheit von Eisen stark erhöht. Der Induktionswert beträgt in den verschiedenen Replikaten eine log2 FC von 7-8 (Tabelle 21, WT+Fe/WT-Fe). Werden die Transkriptmengen in Anwesenheit von Eisen

zwischen dem Wildtypstamm und dem Regulatormutantenstämmen verglichen, so zeigen sich keine Mengenunterschiede und der log2 FC liegt bei 0 bzw. kann den angewandten Schwellenwert von 0,8 nicht überschreiten (Tabelle 21, WT+Fe/ Δ +Fe). Ein Vergleich der Transkriptmengen im Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen mit den Regulatormutantenstämmen in Abwesenheit von Eisen zeigte ähnliche Expressionsstärken in den Mutantenstämmen Δirr und $\Delta rirA$ wie unter identischen Bedingungen im Wildtypstamm. Allerdings nahm die Transkriptmenge sowohl für den Δfur Mutantenstamm mit einem log2 FC von 5,25 als auch für den $\Delta iscR$ Mutantenstamm mit einem log2 FC von 3,85 deutlich ab (Tabelle 21, WT+Fe/ Δ -Fe). Werden die Transkriptmengen in Abwesenheit von Eisen im Wildtypstamm mit den Transkriptmengen in den Regulatormutantenstämmen in Anwesenheit von Eisen verglichen, liegen die log2 FC Werte zwischen -6,32 und -8,07 (Tabelle 21, WT-Fe/ Δ +Fe). Diese Werte zeigen, dass in Anwesenheit von Eisen eine deutlich geringere Transkriptmenge in allen Regulatormutanten zu finden war. Ein Vergleich der Transkriptmengen im Wildtypstamm mit den Transkriptmengen in den Regulatormutanten jeweils unter Eisenmangel zeigte keine Mengenunterschiede für die Mutantenstämmen Δirr und $\Delta rirA$. Allerdings war in den Mutantenstämmen Δfur und $\Delta iscR$ deutlich mehr Transkript zu finden als im Wildtypstamm. Dies resultierte in log2 FC Werten von -2 bis -2,73 (Tabelle 21, WT-Fe/ Δ -Fe). Die Transkriptmengen in dem jeweiligen Mutantenstamm in Anwesenheit von Eisen verglichen mit Transkriptmengen unter Eisenmangelbedingungen, zeigten eine starke Induktion in den Mutantenstämmen Δirr und $\Delta rirA$, die der Induktion unter identischen Bedingungen im Wildtyp entspricht. Für die Mutantenstämme Δfur und $\Delta iscR$ hingegen konnten nur geringere log2 FC Werte von 5,79 und 3,23 verglichen zum Wildtypstamm beobachtet werden (Tabelle 21, Δ +Fe/ Δ -Fe).

Tabelle 21: Regulation des Gens *Dshi_0575* durch die Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR. Die Werte entsprechen dem log2 FC und das Symbol Δ steht für den jeweiligen Regulatormutantenstamm.

	WT+Fe / WT-Fe	WT+Fe / Δ +Fe	WT+Fe / Δ -Fe	WT-Fe / Δ +Fe	WT-Fe / Δ -Fe	Δ +Fe / Δ -Fe
IscR	7,10	0,69	3,85	-6,32	-2,73	3,23
RirA	8,10	0,24	7,48	-8,07	-0,54	7,34
Fur	7,23	-0,05	5,25	-7,51	-2,00	5,79
Irr	7,23	0,04	6,27	-6,93	0,35	6,20

Unter diesen Bedingungen würden log2 FC Werte um 0 für eine Regulation dieses Gens durch den untersuchten Regulator hindeuten. Ähnlich starke Expressionen wie im Wildtypstamm zeigen, dass die jeweilige Mutante nicht an der Regulation beteiligt ist. Log2 FC Werte die dazwischen liegen, sprechen für eine Beteiligung der jeweiligen Regulatoren an der Regulation des Gens. Für das Gen *Dshi_0575* bedeutet dies, dass sowohl der Fur Regulator als auch der IscR Regulator einen Einfluss auf die Genexpression hat, wobei aufgrund der beobachteten Transkriptmengen der IscR Regulator den stärkeren Einfluss ausübt. Die Daten deuten darauf hin, dass beide Regulatoren ohne Eisen als Aktivator auf den Promotor *Dshi_0575* und das *hmu* Operon wirken.

Ein Vergleich der Transkriptmengen für das Gen *irpA* in Anwesenheit von Eisen im Wildtypstamm mit der Transkriptmenge unter Eisenmangel zeigte eine starke Eisenmangelinduktion mit log2 FC Werten von 7,23 bis 8,10 (Tabelle 22, WT+Fe/WT-Fe). In Anwesenheit von Eisen ist die Transkriptmenge sowohl im Wildtypstamm als auch in den Mutantenstämmen Δfur , Δirr und $\Delta iriA$ nahezu identisch. Dort liegen log2 FC Werte um 0 vor, bzw. unter dem Schwellenwert von 0,8 (Tabelle 22, WT+Fe/ Δ +Fe). Allerdings zeigt sich in dem $\Delta iscR$ Mutantenstamm eine erhöhte Transkriptmenge verglichen zum Wildtypstamm mit einem log2 FC von 1,47. Eine ähnliche Induktion mit einem log2 FC von 1,49 ist auch bei einem Vergleich der Transkriptmengen des Wildtypstamms in Anwesenheit von Eisen mit dem $\Delta iscR$ Mutantenstamm in Abwesenheit zu beobachten (Tabelle 22, WT+Fe/ Δ -Fe). Zwar ist auch hier die Transkriptmenge im $\Delta iscR$ Mutantenstamm höher als im Wildtypstamm, allerdings ist die Expression in den anderen Regulatormutantenstämmen deutlich höher. In den anderen Regulatormutanten entsprechen die Werte von 5,47 bis 6,07 denen des Wildtypstamms unter identischen Bedingungen. Ein Vergleich der Transkriptmengen im Wildtypstamm unter Eisenmangel mit den Transkriptmengen in den Regulatormutantenstämmen in Anwesenheit von Eisen zeigen deutlich, dass in Anwesenheit von Eisen die Transkriptmengen in den Regulatormutanten deutlich geringer sind als unter Eisenmangel im Wildtypstamm (Tabelle 22, WT-Fe/ Δ +Fe). Die Transkriptmengen in Abwesenheit von Eisen im Wildtypstamm verglichen mit den Transkriptmengen der Regulatormutanten Δfur , Δirr und $\Delta iriA$ unter identischen Bedingungen zeigen keinen signifikanten Unterschied. Allerdings ist die Transkriptmenge im

$\Delta iscR$ Mutantenstamm deutlich geringer was in einem log2 FC von -4,29 resultiert (Tabelle 22, WT-Fe/ Δ -Fe).

Tabelle 22: Regulation des Gens *irpA* durch die Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR. Die Werte entsprechen dem log2 FC und das Symbol Δ steht für den jeweiligen Regulatormutantenstamm.

	WT+Fe / WT-Fe	WT+Fe / Δ +Fe	WT+Fe / Δ -Fe	WT-Fe / Δ +Fe	WT-Fe / Δ -Fe	Δ +Fe / Δ -Fe
IscR	6,08	1,47	1,49	-4,76	-4,29	0,20
RirA	5,57	-0,71	5,47	-6,69	-0,35	6,20
Fur	6,45	0,24	5,61	-5,97	-0,48	5,35
Irr	6,45	0,73	6,07	-5,24	0,54	5,28

Eine Betrachtung der Transkriptmengen in An- und Abwesenheit von Eisen in den jeweiligen Mutantenstämmen zeigte, dass für die Mutantenstämme Δfur , Δirr und $\Delta rirA$ eine nahezu identische Expression beobachtet wurden wie im Wildtypstamm unter diesen Bedingungen mit einer deutlich höheren Transkriptmenge in der Abwesenheit von Eisen. Die Transkriptmengen im $\Delta iscR$ Mutantenstamm sind sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Eisen gleich (Tabelle 22, Δ +Fe/ Δ -Fe). Die Daten zeigten, dass der Promotor *irpA* ebenso wie das gesamte Operon einzig durch den IscR Regulator reguliert werden. Ohne den IscR Regulator gibt es unter Eisenmangel keine Induktion der Genexpression. Somit deuten die Daten darauf hin, dass der IscR Regulator in seiner *apo*-Form als Aktivator wirkt.

Das dritte Operon des eisenabhängig regulierten Genclusters bildet das TonB System, welches über den *exbB* Promotor gesteuert wird. Ein Vergleich der Expressionsdaten im Wildtypstamm in An- und Abwesenheit von Eisen zeigen eine deutlich erhöhte Transkriptmenge unter Eisenmangel, welche in log2-FC Werten von 4,34 bis 5,34 resultiert (Tabelle 23, WT+Fe/WT-Fe). Eine Betrachtung der Transkriptmengen im Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen verglichen mit den Regulatormutantenstämmen unter dieser Bedingung, zeigten keine Unterschied in der Transkriptmenge für die Mutantenstämme $\Delta iscR$, $\Delta rirA$ und Δfur . Im Δirr Mutantenstamm hingegen war das Transkriptlevel in Anwesenheit von Eisen signifikant höher als im Wildtypstamm (Tabelle 23, WT+Fe/ Δ +Fe). Die Transkriptmenge im Wildtypstamm in der Anwesenheit von Eisen war verglichen mit den Transkriptmengen in den Regulatormutantenstämmen unter Eisenmangel deutlich geringer (Tabelle 23, WT+Fe/ Δ -Fe). Allerdings waren die Transkriptmengen in den Regulatormutantenstämmen $\Delta iscR$, Δirr und Δfur mit log2 FC Werten von 2,32, 3,68 und

3,51 geringer als die Transkriptmengen im Wildtypstamm unter identischen Bedingungen. Ein Vergleich der Transkriptmengen im Wildtypstamm in Abwesenheit von Eisen mit den Transkriptmengen der Regulatormutantenstämme in Anwesenheit von Eisen zeigten, dass die Transkriptmenge in den Regulatormutanten deutlich niedriger war als im Wildtypstamm (Tabelle 23, WT-Fe/ Δ +Fe). Herrscht sowohl im Wildtypstamm als auch in den Regulatormutanten Eisenmangel, ist die Transkriptmenge im Δ *rirA* sowie Δ *irr* Mutantenstamm ähnlich zu der Transkriptmenge im Wildtypstamm mit resultierenden log2 FC Werten um 0. Sowohl im Δ *iscR* Mutantenstamm wie auch im Δ *fur* Mutantenstamm waren die Transkriptmengen geringer als im Wildtypstamm. Daher ergaben sich log2 FC Werte von -1,96 und -1,62 (Tabelle 23, WT-Fe/ Δ -Fe). Ein Vergleich des Transkriptlevels in An- und Abwesenheit von Eisen in den jeweiligen Regulatormutantenstämmen zeigte, dass die Menge an Transkript unter Eisenmangel deutlich höher ist als in Anwesenheit von Eisen. Allerdings ist sie in den Mutantenstämmen Δ *iscR*, Δ *fur* und Δ *irr* mit log2 FC Werten von 1,86, 3,36 und 3,66 deutlich geringer als im Wildtypstamm unter diesen Bedingungen (Tabelle 23, Δ +Fe/ Δ -Fe).

Tabelle 23: Regulation des Gens *exbB* durch die Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR. Die Werte entsprechen dem log2 FC und das Symbol Δ steht für den jeweiligen Regulatormutantenstamm.

	WT+Fe / WT-Fe	WT+Fe / Δ +Fe	WT+Fe / Δ -Fe	WT-Fe / Δ +Fe	WT-Fe / Δ -Fe	Δ +Fe / Δ -Fe
IscR	4,52	0,28	2,32	-3,94	-1,96	1,86
RirA	4,34	-0,45	3,68	-4,77	-0,53	4,10
Fur	5,34	0,62	3,51	-4,97	-1,62	3,36
Irr	5,34	0,90	3,68	-4,60	-0,42	3,66

Dies deutet für die Regulation des TonB Operons darauf hin, dass der Irr Regulator als Repressor in Anwesenheit von Eisen wirkt, während die Regulatoren IscR und Fur aktivierend wirken. Erneut ist auch hier der stärkste Einfluss durch den IscR Regulator zu beobachten gewesen.

Eine weitere transkriptionelle Einheit des eisenabhängig regulierten Genclusters bildet das Gen *fhuA*, welches für einen TonB abhängigen Rezeptor codiert. Dieses ist ebenfalls unter Eisenmangel stark induziert, was an log2 FC Werten von 5,08 bis 5,45 im Wildtypstamm zu erkennen ist (Tabelle 24, WT+Fe/WT-Fe). Die Transkriptmengen im Wildtypstamm in der Anwesenheit von Eisen entsprechen den Transkriptmengen in den Mutan-

tenstämmen $\Delta rirA$, Δfur und Δirr unter diesen Bedingungen. Nur im $\Delta iscR$ Mutantenstamm ist die Transkriptmenge deutlich höher verglichen zum Wildtypstamm mit einem \log_2 FC von 1,17. Ein Vergleich der Transkriptmengen im Wildtypstamm in Anwesenheit von Eisen mit den Regulatormutantenstämmen ohne Eisen, zeigte eine deutlich erhöhte Transkriptmenge in den Regulatormutanten mit \log_2 FC Werten von 2,99 bis 4,34 (Tabelle 24, WT+Fe/ Δ -Fe). Dennoch erreichen diese Transkriptmengen nicht das Transkriptlevel, welches im Wildtypstamm unter diesen Bedingungen beobachtet worden ist. In Anwesenheit von Eisen wird in den Regulatormutanten deutlich weniger Transkript gemessen als im Wildtypstamm unter Eisenmangel (Tabelle 24, WT-Fe/ Δ +Fe). Dies resultiert in \log_2 FC Werten von -3,92 bis -5,43. Unter Eisenmangel entspricht die Transkriptmenge des Δirr Mutantenstammes dem des Wildtypstamms in Abwesenheit von Eisen. Die Transkriptmengen in den Mutantenstämmen $\Delta iscR$, $\Delta rirA$ und Δfur liegen deutlich unter der gemessenen Transkriptmenge im Wildtypstamm unter Eisenmangel (Tabelle 24, WT-Fe/ Δ -Fe). Dies ist deutlich durch \log_2 FC Werte von -1 bis -2,14 zu erkennen. Die Transkriptmengen innerhalb der Regulatormutantenstämmen sind unter Eisenmangel deutlich höher als in Anwesenheit von Eisen (Tabelle 24, Δ +Fe/ Δ -Fe). Allerdings kommen auch hier die Transkriptlevel nicht an die Transkriptlevel des Wildtypstamms unter identischen Bedingungen heran. Diese Ergebnisse zeigen erneut deutlich den starken Einfluss des IscR Regulators auf die Genexpression von *fhuA*, allerdings sind auch Einflüsse der Regulatoren RirA, Irr und Fur zu beobachten, wobei diese auch auf sekundären Effekten beruhen könnten.

Tabelle 24: Regulation des Gens *fhuA* durch die Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR. Die Werte entsprechen dem \log_2 FC und das Symbol Δ steht für den jeweiligen Regulatormutantenstamm

	WT+Fe / WT-Fe	WT+Fe / Δ +Fe	WT+Fe / Δ -Fe	WT-Fe / Δ +Fe	WT-Fe / Δ -Fe	Δ +Fe / Δ -Fe
IscR	5,08	1,17	2,99	-3,92	-1,65	1,91
RirA	5,45	0,11	4,34	-5,35	-1,00	4,19
Fur	5,20	-0,10	3,04	-5,43	-2,14	3,26
Irr	5,20	0,09	3,90	-5,35	-0,17	4,39

Die Auswertung der Transkriptomanalysen zeigte deutlich, den starken Einfluss des IscR Regulators auf die Expression der Gene des eisenabhängigen Genclusters. Um aber den Einfluss der vier Regulatoren auf die eisenabhängige Genexpression in *D. shibae*

genauer zu untersuchen wurden Promotor-*lacZ* Reporterfusionen für weitere Analysen genutzt.

Hierzu wurde ein Reportersystem etabliert, bei dem die Promotoren über ligationsunabhängige Klonierung vor das promotorlose β -Galaktosidase Gen (*lacZ*) in den Vektor pBBR-MCS-5 kloniert wurden. Für die Analysen wurde ein 480 bp langes Fragment des *Dshi_0575* Promotors, ein 491 bp langes Fragment des *irpA* Promotors und ein 472 bp langes Fragment des *exbB* Promotors verwendet. Nach konjugalem Transfer in den *D. shibae* DFL12^T Wildtypstamm wurden β -Galaktosidase Aktivitäten nach Kultivierung mit bzw. ohne 15 μ M FeSO₄ bestimmt.

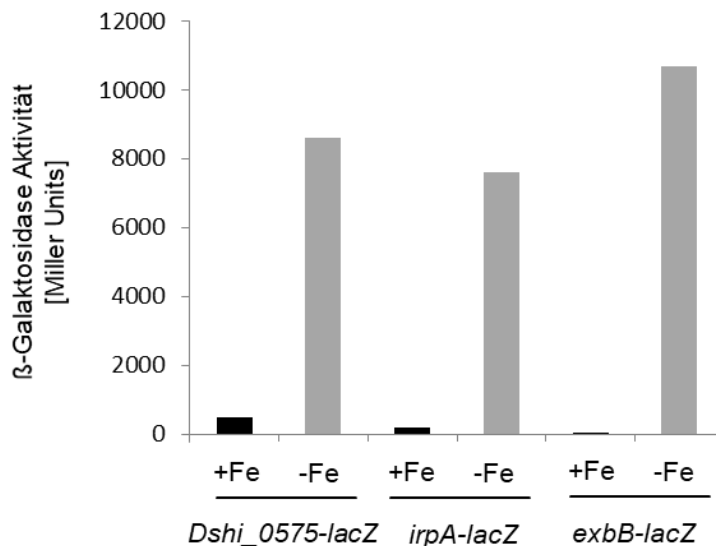


Abb. 75: β -Galaktosidase Aktivitäten der Promotoren *Dshi_0575*, *irpA* und *exbB*. Es wurde ein 480 bp langes Fragment des *Dshi_0575* Promotors, ein 491 bp langes Fragment des *irpA* Promotors sowie ein 472 bp langes Fragment des *exbB* Promotors gewählt und die Aktivität im *D. shibae* Wildtyp Stamm untersucht. Dargestellt ist der Median der β -Galaktosidase Aktivität aus drei biologischen Replikaten, von denen jeweils drei technische Replikate vermessen worden sind. Die Proben wurden in SWM Medium mit (schwarz) bzw. ohne (grau) 15 μ M FeSO₄ angezogen, nach 16 h Inkubation bei 30 °C in der logarithmischen Wachstumsphase mit einem Probenvolumen von 250 μ l abgenommen und ein β -Galaktosidase Assay durchgeführt. Die β -Galaktosidase Aktivität wurde in Miller Units aufgetragen.

Für alle drei getesteten Fragmente war im Wildtypstamm eine hohe β -Galaktosidase Aktivität unter Eisenmangel gemessen worden (Abb. 75). Das *Dshi_0575-lacZ* Reportergekonstrukt ergab unter Eisenmangel eine β -Galaktosidase Aktivität von 8648 Miller Units. Verglichen zu den 500 Miller Units, die in Anwesenheit von Eisen gemessen wurden entspricht dies einer 17-fachen Induktion. Eine ähnlich starke Induktion unter Eisen-

mangel wurde auch für den *irpA* Promotor beobachtet. Mit einer β -Galaktosidase Aktivität von 7621 Miller Units ist diese um das 40-fache erhöht, verglichen zu den gemessenen 188 Miller Units in Anwesenheit von Eisen. Die höchste β -Galaktosidase Aktivität unter Eisenmangel konnte für den *exbB* Promotor mit 10678 Miller Units gemessen werden. Dies entspricht einer 279-fachen Induktion verglichen zu den gemessenen 36 Miller Units in Anwesenheit von Eisen. Die in den Transkriptomanalysen beobachtete starke Induktion dieser drei Gene, konnte auch in den Experimenten mittels Reporterengenfusionen gefunden werden. Das zeigt, dass die Promotorfragmente alle regulatorischen Sequenzen für die eisenabhängige Induktion beinhalten.

Um den Einfluss der Regulatoren auf die Expression der *Dshi_0575-lacZ* und *irpA-lacZ* Reportergenkonstrukte zu untersuchen, wurden die Vektoren mit den Reportergenkonstrukten auch in die Δfur , Δirr , $\Delta rirA$ und $\Delta iscR$ Mutantenstämmen eingebracht und die eisenabhängige Expression untersucht. Zuerst wurde das Reportergenkonstrukt *Dshi_0575-lacZ* analysiert (Abb. 76). Der Wildtypstamm zeigte wie erwartet eine starke Eisenmangelinduktion mit einer β -Galaktosidase Aktivität von 8648 Miller Units. In Anwesenheit von Eisen war in dem Δfur Mutantenstamm eine β -Galaktosidase Aktivität von 42 Miller Units und in Abwesenheit von 1559 Miller Units gemessen worden. Die β -Galaktosidase Aktivität in dem Δirr Mutantenstamm entspricht mit 6152 Miller Units unter Eisenmangel in etwa der β -Galaktosidase Aktivität des Wildtypstamms unter dieser Bedingung (Abb. 76). In dem $\Delta rirA$ Mutantenstamm war in Anwesenheit von Eisen eine β -Galaktosidase Aktivität von 49 Miller Units und in Abwesenheit eine β -Galaktosidase Aktivität von 1617 Miller Units gemessen worden (Abb. 76). Der $\Delta iscR$ Mutantenstamm wies in Anwesenheit von Eisen eine β -Galaktosidase Aktivität von 91 Miller Units und in der Abwesenheit von Eisen von 125 Miller Units auf (Abb. 76). Die im Wildtypstamm beobachtete Eisenmangelinduktion konnte nur in dem Δirr Mutantenstamm ebenfalls nachgewiesen werden. Für den Δfur und $\Delta rirA$ Mutantenstamm war eine deutlich geringere Induktion unter Eisenmangel zu beobachten gewesen. Diese verminderte Induktion unter Eisenmangel deutet auf einen Einfluss der Regulatoren Fur und RirA auf die Regulation des *Dshi_0575* Gens hin. Wobei beide Regulatoren eine aktivierende Wirkung auf die Genexpression unter Eisenmangel hätten. Im $\Delta iscR$ Mutantenstamm war der deutlichste Unterschied zum Wildtypstamm zu erkennen. Es fand sowohl in An- als auch Abwesenheit von Eisen keine Genexpression mehr statt. Die fehlende Induktion unter Eisenmangel, weist auf eine *apo-IscR* Induktion unter Eisenmangel hin.

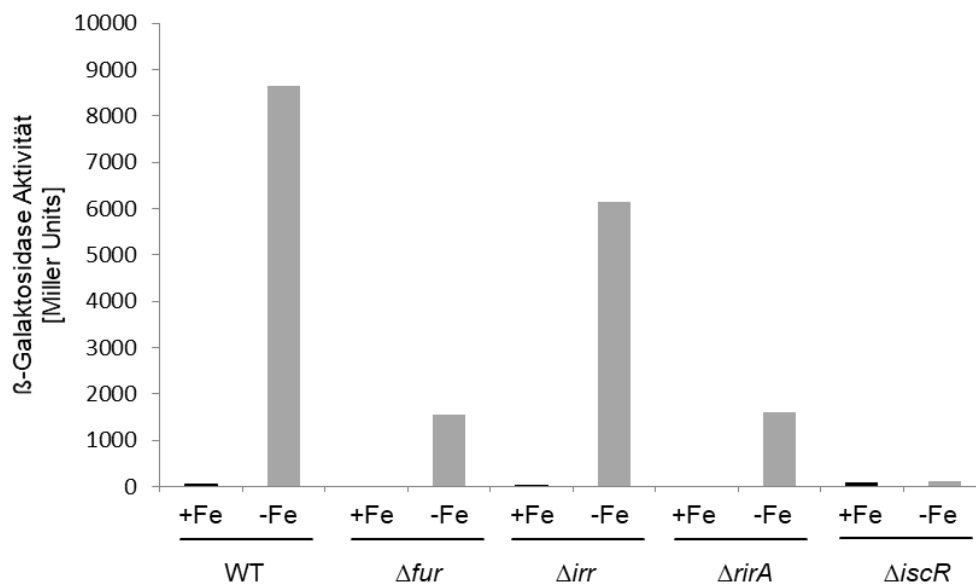


Abb. 76: β -Galaktosidase Aktivität der *Dshi_0575-lacZ* Reportergenfusion. Es wurde ein 480 bp langes Fragment von Position -480 bis -1 in Bezug zum Translationsstart des *Dshi_0575* Promotors gewählt und die β -Galaktosidase Aktivität im *D. shibae* Wildtyp Stamm (WT) sowie in der Δfur Mutante (Δfur), der Δirr Mutante (Δirr), der $\Delta rirA$ Mutante ($\Delta rirA$) und der $\Delta iscR$ Mutante ($\Delta iscR$) untersucht. Dargestellt ist der Median der β -Galaktosidase Aktivität aus drei biologischen Replikaten, von denen jeweils drei technische Replikate vermessen worden sind. Die Proben wurden in SWM Medium mit (+Fe) bzw. ohne (-Fe) 15 μ M $FeSO_4$ angezogen, nach 16 h Inkubation bei 30 °C mit einem Probenvolumen von 250 μ l abgenommen und ein β -Galaktosidase Assay durchgeführt. Die β -Galaktosidase Aktivität wurde in Miller Units aufgetragen.

Dieses Ergebnis unterstützt die Daten der Transkriptomanalyse, dass der IscR Regulator maßgeblich an der Regulation von *Dshi_0575* beteiligt ist. Der Einfluss des Fur Regulators auf die Genexpression wurde auch bereits in der Transkriptomanalyse beobachtet, allerdings ist der Einfluss des RirA Regulators erst auf Proteinebene zu beobachten gewesen.

In der 480 bp langen Sequenz des verwendeten Promotorfragments ist eine potentielle Iron Rhodo Box und somit eine mögliche IscR Bindestelle gefunden worden (Abb. 77). Teile der IscR Bindestelle werden auch in der IRO Box, dem möglichen Bindemotiv von RirA gefunden. Somit könnten der IscR Regulator und der RirA Regulator um eine nahezu identische Bindestelle konkurrieren. Allerdings wurde keine potentielle Fur-Box identifiziert. Dies könnte ein Hinweis für einen indirekten Einfluss des Fur Regulators auf die Genexpression von *Dshi_0575* sein.

AAGATCAGGCAGGATAACGGCCGGATGCGGGGTCCAGTTGCCGCGTTCTGGGACCTGCTGA
 AAGACTAACGGTCAAAGGCGAGCCCCGATGCAACAAATCGAAAACGGCATCCGGTTGGACG
 ACAAGCTAATCCTCAAAGATGACAACCTCGGCGCCCATGCCACCAATCTGAGATCGAGAAA
 TGCGCCGAAGCAGACAGCACTAAGCTTTGATTGCTGTACGCTTCTGCAATGGCCCAACCCC
 GAGCATGACCAGCCTTGCAATTCCC**GATAAGTTCTGTC**AGGATTAATTTGCCAGCCAAGC
 CTCGATCTGAGCCCGGCTCCATTGTGATCGTTGCAACGGTGCGCATCTCTTCGCGCATTGC
 AACAAAGGAGGCTGGACATGCTTTTACATCTATTCCTTTCCAACCCGTTCCGCGCCGCTG
 GAACGCTCCGCAACAGCCTGGCCTTGCGCCCATCCGAAGCGGAGCCGTTATCG**ATG**

Abb. 77: Sequenz des *Dshi_0575* Promotors. Dargestellt ist ein 480 bp langes Fragment des *Dshi_0575* Promotors (schwarz). Der Translationsstart ist hervorgehoben und die potentielle IscR Bindestelle gelb markiert. Das verkürzte 150 bp Fragment des *Dshi_0575* Promotors ist blau markiert.

Im weiteren Verlauf wurde das *irpA-lacZ* Reporterergenkonstrukt untersucht (Abb. 78). Der Wildtypstamm zeigte die bereits gemessene β -Galaktosidase Aktivität von 7621 Miller Units in Abwesenheit von Eisen. In dem Δfur Mutantenstamm stieg die β -Galaktosidase Aktivität unter Eisenmangel weiter an auf 8829 Miller Units und im Δirr Mutantenstamm sogar auf 12902 Miller Units. Die im Wildtypstamm sowie dem Δfur und Δirr Mutantenstamm beobachtete starke Induktion unter Eisenmangel ging im $\Delta rirA$ Mutantenstamm auf 1123 Miller Units zurück. Eine ebenfalls deutlich verminderte Induktion mit einer β -Galaktosidase Aktivität von 1027 Miller Units wurde auch im $\Delta iscR$ Mutantenstamm beobachtet. Diese Ergebnisse weisen auf eine *apo*-RirA sowie *apo*-IscR Aktivierung des *irpA* Gens unter Eisenmangel hin. Die Aktivierung durch *apo*-IscR wurde bereits in den Transkriptomdaten beobachtet. Die leicht gesteigerte β -Galaktosidase Aktivität im Δfur und Δirr Mutantenstamm, könnte durch leichte sekundäre Effekte entstanden sein, die nicht direkt mit der Regulation des *irpA* Gens zusammen hängen. Der beobachtete Einfluss von RirA aus den Experimenten der Reporterergenfusionen konnte in den Transkriptomanalysen nicht beobachtet werden. Da in den Transkriptomanalysen Einflüsse auf Transkriptebeine untersucht werden, während in den Reporterergenfusionen die Menge an akkumuliertem Protein gemessen wird, könnte der Einfluss von RirA erst auf Proteinebene auftreten.

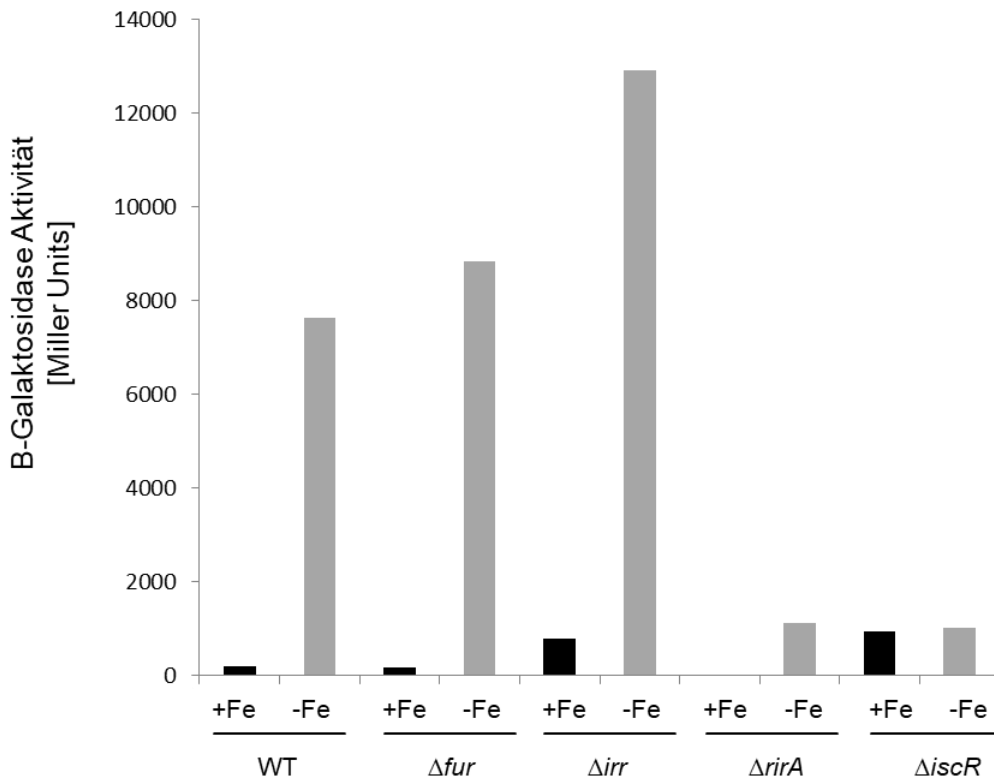


Abb. 78: β -Galaktosidase Aktivität des *irpA* Promotors. Es wurde ein 491 bp langes Fragment des *irpA* Promotors gewählt und die Aktivität im *D. shibae* Wildtyp Stamm (WT) sowie in der Δfur Mutante (Δfur), der Δirr Mutante (Δirr), der $\Delta rirA$ Mutante ($\Delta rirA$) und der $\Delta iscR$ Mutante ($\Delta iscR$) untersucht. Dargestellt ist der Median der β -Galaktosidase Aktivität aus drei biologischen Replikaten, von denen jeweils drei technische Replikate vermessen worden sind. Die Proben wurden in SWM Medium mit (+Fe) bzw. ohne (-Fe) 15 μM $FeSO_4$ angezogen, nach 16 h Inkubation bei 30 °C mit einem Probenvolumen von 250 μl abgenommen und ein β -Galaktosidase Assay durchgeführt. Die β -Galaktosidase Aktivität wurde in Miller Units aufgetragen.

Da in den *irpA-lacZ* Reporterergenkonstrukten ein Effekt sowohl durch RirA als auch durch IscR beobachtet wurde, wurde nach möglichen Bindestellen in der Promotorsequenz geschaut. In dem 491 bp langen Ausschnitt des verwendeten *irpA* Promotorfragments ist eine leicht abgewandelte Iron Rhodo Box zu finden, wie sie auch in *R. sphaeroides* gefunden worden war (Abb. 79) (Remes *et al.*, 2015). Diese Iron Rhodo Box beinhaltet ebenfalls Teilsequenzen der IRO Box, die bioinformatisch als mögliche RirA Bindestelle identifiziert wurde (Rodionov *et al.*, 2006). Somit könnte es auch hier sein, dass beide Regulatoren das nahezu gleiche Sequenzmotiv erkennen und über dieses an die DNA binden.

TGTCTGAAATGGCTCCCAATCCGGTCACGCCGACATGGCACCTGAGGTTAGAGCAAGATC
 GAACCAACTCGCCGGCGCCAAGTCACGCGCGTGCAGCGATTTGCCCTGAACGAGCAAGTC
 GCGACAAAACGGCCCGACGAGTTCTTGACAAAACCAGTCGGGTTGACTTTTCCGACTGAT
 TAACTCAACTTTCCGTCAGTTCAGCCACTCCGTCCCTTGGTCGGGGAAGCCCGACGCAT
 GACACAAAACAGGGCCTGGAAGTTGCACCCAAATACAAGCCAATCATCCACCGCGCAGGC
 ACGACGTCTTGCAGACACCGATCCGCTGGAGGCGCTCATGGCTTCTGCCGAGACGGACGA
 GACGTCTGCGGAATGGATCGCCGATCGCTACA**GATCCGACAATT**GAATGTGACTTTTGA
 TCCGGCGCCTTAGGGCGCGCAACAGCCCTTTTTTCGATTTACGATCTCTCCACATACAG
 GAACAGCCCC**GATG**

Abb. 79: Sequenz des *irpA* Promoters. Dargestellt ist die Sequenz des *irpA* Promotors mit einer Länge von 300 bp. Die potentielle IscR Bindestelle ist gelb markiert. Der Translationsstart ist hervorgehoben.

Diese Ko-Regulation von IscR und RirA setzt die Bindung der Regulatoren an den Promotorbereich voraus. Für das *Dshi_1017* Gen, welches für ein TonB abhängiges Häm/Hämoglobin Rezeptorprotein codiert und in den Transkriptomdaten unter Eisenmangel mit am stärksten induziert war, wurde bereits Bindung sowohl des IscR als auch des RirA Regulators an den Promotorbereich in EMSA Experimenten gezeigt. Die Bindung lässt vermuten, dass beide Regulatoren an der Genregulation von *hemB2* beteiligt sind.

Eine Betrachtung der Transkriptomdaten des *hemB2* Gens aus dem *D. shibae* Wildtypstamm und den Mutantenstämmen zeigte, dass die Transkriptmenge im *D. shibae* Wildtypstamm in Abwesenheit von Eisen deutlich höher ist als in Anwesenheit von Eisen mit log2 FC Werten von 5,19 bis 7,37. In Anwesenheit von Eisen sind die Transkriptlevel im Wildtypstamm sowie in dem Δfur , $\Delta rirA$ und Δirr Mutantenstamm nahezu identisch. Beim $\Delta iscR$ Mutantenstamm hingegen ist in Anwesenheit von Eisen das Transkriptlevel signifikant höher als im Wildtypstamm. Dies deutet zum einen auf eine fehlende Repression im $\Delta iscR$ Mutantenstamm hin und zum anderen gibt es Hinweise auf die reprimierende Funktion eines weiteren Regulators durch den geringen log2 FC von 1,49 im Vergleich zu dem ermittelten log2 FC Wert von 5,19 der Eisenmangel Induktion im Wildtypstamm. Die Funktion von IscR als Repressor in Anwesenheit von Eisen ist auch bei einer Betrachtung der Transkriptmengen in An- und Abwesenheit von Eisen im $\Delta iscR$ Mutantenstamm zu beobachten. Mit einem log2 FC von 1,51 liegt dieser Wert deutlich unter dem log2 FC von 5,19, welcher im Wildtyp ermittelt wurde. Zusätzlich war auch in den übrigen Mutantenstämmen eine leichte Abnahme der Expression unter Eisenmangel zu beobachten. Diese geringeren log2 FC Werte verglichen zum Wildtypstamm könnten

ein weiterer Hinweis für einen anderen Regulator sein, der neben IscR an der Repression der Genexpression des *hemB2* Gens beteiligt ist.

Tabelle 25: Regulation des Gens *hemB2* durch die Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR. Die Werte entsprechen dem log2 FC und das Symbol Δ steht für den jeweiligen Regulatormutantenstamm.

	WT+Fe / WT-Fe	WT+Fe / Δ +Fe	WT+Fe / Δ -Fe	WT-Fe / Δ +Fe	WT-Fe / Δ -Fe	Δ +Fe / Δ -Fe
IscR	5,19	1,49	3,15	-3,84	-1,82	1,51
RirA	7,37	-0,33	5,67	-7,96	-1,49	6,17
Fur	7,29	-0,15	4,63	-7,28	-2,55	4,82
Irr	7,29	-0,07	5,22	-6,60	-0,25	5,15

Um die *hemB2* Regulation genauer zu analysieren, wurden das *hemB2-lacZ* Reporter-genkonstrukt in den *D. shibae* Wildtypstamm sowie die Mutantenstämme Δfur , $\Delta rirA$, Δirr und $\Delta iscR$ eingebracht und die β -Galaktosidase Aktivität unter Bedingungen mit bzw. ohne Zugabe von Eisen bestimmt. Für die Reporter-genfusion mit dem *lacZ* Gen wurde ein Promotorbereich von 155 bp Länge von Position -155 bis -1 in Bezug zum Translationsstart gewählt, der dem verwendeten Fragment der EMSA Analysen entspricht. In Anwesenheit von Eisen wurden im *D. shibae* Wildtypstamm eine β -Galaktosidase Aktivität von 224 Miller Units gemessen (Abb. 80). Unter Eisenmangel Bedingungen war eine erhöhte β -Galaktosidase Aktivität von 670 Miller Units zu beobachten gewesen. Diese Eisenmangel Induktion stimmt mit den Ergebnissen der Transkriptomanalyse überein. Eine nahezu identische Induktion war in dem Δfur und in dem Δirr Mutantenstamm zu beobachten gewesen (Abb. 80). Dies deutet darauf hin, dass sowohl der Fur Regulator als auch der Irr Regulator nicht an der Regulation des *hemB2* Gens beteiligt sind. In Anwesenheit von Eisen wurde in dem $\Delta rirA$ Mutantenstamm eine β -Galaktosidase Aktivität von 222 Miller Units gemessen. Vergleichbar zur gemessenen β -Galaktosidase Aktivität im Wildtypstamm. Allerdings wurde ein deutlicher Anstieg der β -Galaktosidase Aktivität auf 1917 Miller Units in Abwesenheit von Eisen gemessen (Abb. 80). Ein Vergleich der Expression im Wildtypstamm mit der Expression des $\Delta rirA$ Mutantenstamms zeigt, dass der RirA Regulator in der Anwesenheit von Eisen als Repressor fungieren kann. In Abwesenheit von Eisen ist der RirA Regulator in der Lage ein Fe-S Cluster zu koordinieren und an den Promotorbereich zu binden. Dieses Ergebnis wird durch die EMSA Experimente unterstützt, die zeigten, dass nur mit einem intakten Fe-S Cluster Bindung des RirA Regulators an das Sequenzmotiv TTAA-N₁₀-AATT stattfinden konnte. Im $\Delta rirA$ Mutantenstamm kann aufgrund des fehlenden Regulators keine Repression durch RirA mehr

stattfinden. Allerdings war auch in Anwesenheit von Eisen eine De-Repression erwartet worden, da der Regulator in dem $\Delta rirA$ Mutantenstamm nicht vorhanden ist. Dies deutet darauf hin, dass noch ein weiterer Regulator in Anwesenheit von Eisen als Repressor wirkt.

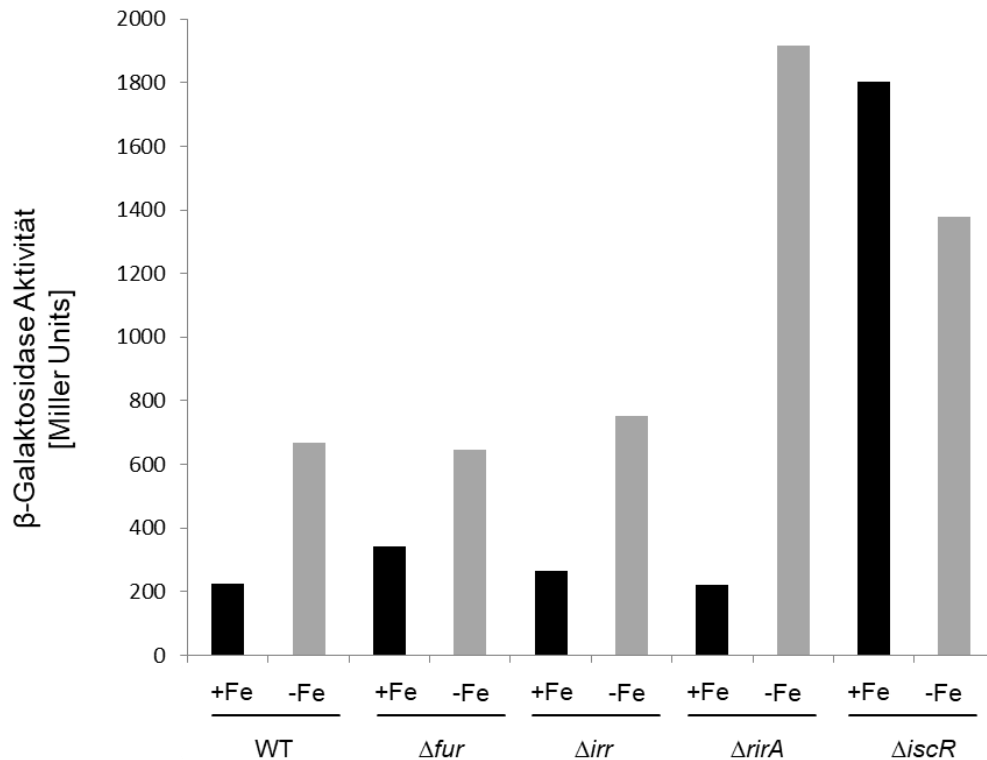


Abb. 80: β -Galaktosidase Aktivität des *hemB2* Promotors. Es wurde ein 155 bp langes Fragment des *hemB2* Promotors gewählt und die Aktivität im *D. shibae* Wildtyp Stamm (WT) sowie in dem Δfur Mutantenstamm (Δfur), dem Δirr Mutantenstamm (Δirr), dem $\Delta rirA$ Mutantenstamm ($\Delta rirA$) und dem $\Delta iscR$ Mutantenstamm ($\Delta iscR$) untersucht. Dargestellt ist der Median der β -Galaktosidase Aktivität aus drei biologischen Replikaten, von denen jeweils drei technische Replikate vermessen worden sind. Die Proben wurden in SWM Medium mit (schwarz) bzw. ohne (grau) 15 μM $FeSO_4$ angezogen, nach 16 h Inkubation bei 30 °C mit einem Probenvolumen von 250 μl abgenommen und ein β -Galaktosidase Assay durchgeführt. Die β -Galaktosidase Aktivität wurde in Miller Units aufgetragen.

Die Analyse der β -Galaktosidase Aktivität im $\Delta iscR$ Mutantenstamm verglichen mit dem Wildtypstamm zeigte einen Anstieg auf 1802 Miller Units in Anwesenheit und auf 1377 Miller Units in Abwesenheit von Eisen (Abb. 80). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der IscR Regulator ebenso wie der RirA Regulator in Anwesenheit von Eisen als Repressor an den *hemB2* Promotorbereich bindet und die Expression reprimiert. Im $\Delta iscR$ Mutantenstamm geht durch den fehlenden IscR Regulator die Repression verloren und es kommt zum deutlichen Anstieg sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Eisen. Eine mögliche Erklärung für den Anstieg der β -Galaktosidase Aktivität in Abwesenheit von Eisen in dem $\Delta rirA$ Mutantenstamm sowie den $\Delta iscR$ Mutantenstamm könnte dadurch zu

erklären sein, dass trotz Eisenmangel beide Regulatoren weiterhin in Teilen als Repressor fungieren, und somit die Genregulation beeinflussen. Erst in den Deletionsmutanten, in denen kein Regulator mehr vorhanden ist, kann es zu dieser erhöhten Expression kommen, die im Wildtypstamm nicht beobachtet werden konnte. Die erhöhte Expression im $\Delta iscR$ Mutantenstamm in Anwesenheit von Eisen zeigte, dass unter diesen Bedingungen der RirA Regulator ebenfalls nicht mehr als Repressor binden kann. Folglich könnte das Fehlen des IscR Regulators auch einen direkten Einfluss auf die Funktion des RirA Regulators haben.

Das *iscR* Gen aus *D. shibae* ist der Start des *suf* Operons, welches neben einigen Genen, die für hypothetische Proteine codieren, die Gene *nifS*, *sufB*, *sufC*, *sufD* und *sufS* enthält, die für Proteine der Fe-S Cluster Biogenese codieren (Abb. 81, A). Die Gene *nifS* und *sufS* codieren für Cystein Desulfurasen, die Gene *sufB* und *sufD* für „Fe-S Cluster assembly proteins“ und das Gen *sufC* für ein „Fe-S Cluster assembly ATP binding protein“. Diese Gene sind an dem Aufbau von Fe-S Clustern beteiligt. Da der RirA Regulator ein Fe-S Cluster koordiniert und seine Funktion von diesem Cluster abhängt, hat die Funktionalität des Suf-Systems einen direkten Einfluss auf RirA.

[A]



[B]

```

GGATGCCTGTCCTCTCACGCGCTTGCCGTTTGCGTCGTCTGTTTT
      -35      -14
CTTGA CGAATTCAA TC GGGCAA TCTAGAACCA TTC AAA CCGAGCGTTG
   IscR Box (IRO)      Irr Box (ICE)
TGGAAACCGGCCCTGTGCAATTAATTAAGGAAAGCAGGGGCGCAGGTCA

ATGTGCGGCGGCCGTTGCAGGGGAGGGGATCGTG

```

Abb. 81: Schematischer Aufbau des *suf* Operons und *IscR* Promotor Sequenz. A: Schematischer Aufbau des *suf* Operons, welches für die Gene des Fe-S Cluster Aufbaus codiert. Der mögliche Transkriptionsstart ist mit einem Pfeil markiert, das Startgen des Operons ist rot markiert, die weiteren bereits annotierten Gene blau und alle unbekannten Gene grau. B: 178 bp langer Ausschnitt des *iscR* Promotors. Der Translationsstart ist blau hervorgehoben, der potentielle Transkriptionsstart ist durch einen Pfeil markiert. Die -14 und -35 Regionen sind angegeben. Die potentielle IscR Bindestelle (gelb) und die potentielle Irr Bindestelle (grün) sind markiert.

Zusätzlich steht das *iscR* Gen nicht nur am Anfang des Operons, welches für den Aufbau von Fe-S Clustern verantwortlich ist, sondern der IscR Regulator selbst führt zu einer Autoregulation durch Bindung an den eigenen Promotorbereich. Diese Autoregulation wurde zuerst in *E. coli* beobachtet (Giel *et al.*, 2013). Darüber hinaus konnte auch bereits Bindung des IscR Regulators aus *D. shibae* an seinen eigenen Promotorbereich durch EMSA Analysen bestätigt werden. Wie bereits gezeigt, besitzt der *iscR* Promotor eine potentielle IscR Bindestelle und darüber hinaus wurde auch eine potentielle Bindestelle für den Irr Regulator gefunden (Abb. 81, B). Der Irr Regulator aus *B. japonicum* bindet unter Eisenmangel an die ICE Box und fungiert als Repressor (Rodionov *et al.*, 2006). Diese beiden vorhandenen Bindestellen geben einen Hinweis für eine Doppelregulation des *iscR* Promotors durch die Regulatoren IscR und Irr. Um diese Ko-Regulation näher zu untersuchen, wurde ein 195 bp langer Abschnitt des *iscR* Promotors von Position -173 bis +22 in Bezug zum Translationsstart gewählt und über ligationsunabhängige Klonierung vor das *lacZ* Reportergen kloniert und die β -Galaktosidase Aktivität im *D. shibae* Wildtypstamm sowie in dem Δirr und $\Delta iscR$ Mutantenstamm analysiert.

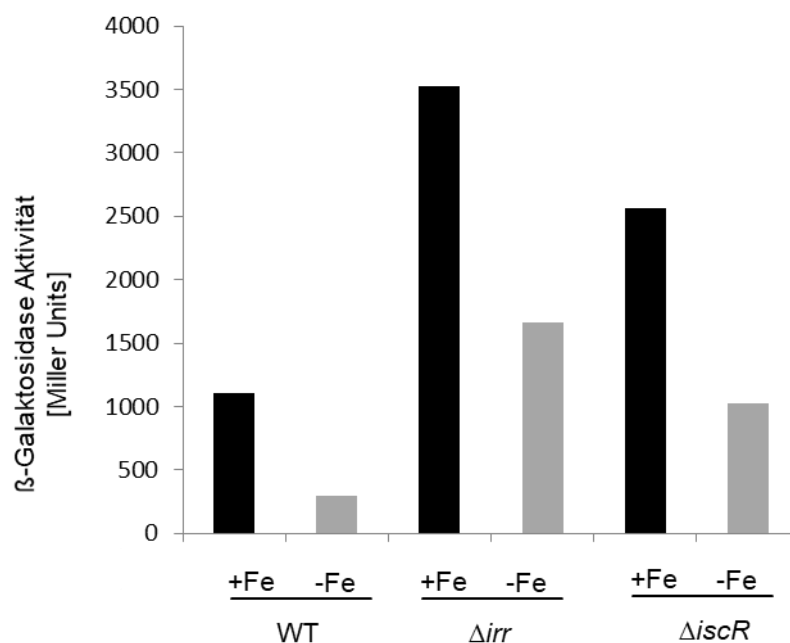


Abb. 82: β -Galaktosidase Aktivität des *iscR* Promotors. Es wurde ein 195 bp langes Fragment des *iscR* Promotors gewählt und die Aktivität im *D. shibae* Wildtyp Stamm (WT) sowie im $\Delta iscR$ Mutantenstamm ($\Delta iscR$) und dem Δirr Mutantenstamm (Δirr) untersucht. Dargestellt ist der Median der β -Galaktosidase Aktivität aus drei biologischen Replikaten, von denen jeweils drei technische Replikate vermessen worden sind. Die Proben wurden in SWM Medium mit (schwarz) bzw. ohne (grau) 15 μ M $FeSO_4$ angezogen, nach 16 h Inkubation bei 30 °C mit einem Probenvolumen von 250 μ l abgenommen und ein β -Galaktosidase Assay durchgeführt. Die β -Galaktosidase Aktivität wurde in Miller Units aufgetragen.

Im Wildtypstamm ist eine Induktion der β -Galaktosidase Aktivität in Anwesenheit von Eisen zu beobachten. Die Aktivität von 1110 Miller Units in Anwesenheit von Eisen sinkt auf 291 Miller Units unter Eisenmangel (Abb. 82). Da für den Aufbau von Fe-S Clustern dringend Eisen benötigt wird, ist ein Anstieg der Expression in der Anwesenheit von Eisen sinnvoll. Im Δirr Mutantenstamm wurden in Anwesenheit von Eisen 3526 Miller Units und in Abwesenheit von Eisen 1667 Miller Units gemessen (Abb. 82). Beide Werte steigen im Vergleich zum Wildtypstamm stark an. In Abwesenheit von Irr kommt es zu einer De-Repression. Bei Eisenverfügbarkeit bindet ein Häm an den Irr Regulator aus *B. japonicum*, was zur Degradation des Proteins führt und zu einer De-Repression der Gene (Qi *et al.*, 1999). Unter Eisenmangel bindet der Irr Regulator stabil an die ICE Box und es kommt zur Repression der Gene. In der Δirr Mutante fehlt der Regulator vollständig und es kann keine Repression stattfinden.

Eine Betrachtung der β -Galaktosidase Aktivität in dem $\Delta iscR$ Mutantenstamm zeigte, dass in Anwesenheit von Eisen die Aktivität auf 2566 Miller Units und in Abwesenheit von Eisen auf 1021 Miller Units anstieg (Abb. 82). Auch hier steigen beide Werte in Abwesenheit von IscR an, was auf eine Repression durch IscR hinweist. Für den IscR Regulator aus *D. shibae* wird aus voran gegangenen Analysen postuliert, dass er Häm als Kofaktor binden kann. Für die Regulation des *iscR* Gens würde dies bedeuten, dass IscR in Anwesenheit von Eisen Häm bindet und mit gebundenem Häm an den Promotorbereich bindet, was zu einer Aktivierung der Genexpression führt. Diese Art der Regulation kann aber im $\Delta iscR$ Mutantenstamm nicht beobachtet werden. Zusätzlich ist der Irr Regulator an der Genexpression von *iscR* beteiligt und reguliert darüber auch die IscR Proteinmenge. Somit ist diese Regulation weitaus komplexer und darüber hinaus messen beide Regulatoren über dasselbe Signalmolekül sprich Häm, den Gehalt an Eisen in der Zelle.

Möglicherweise bindet IscR mit einer höheren Affinität als Irr Häm wodurch der Einfluss von Irr auf die Genexpression stärker wäre. Dies würde zu einer Expression des *iscR* Gens durch gebundenem *holo*-IscR und zu einer geringen De-Repression durch Irr ohne gebundenes Häm führen (Abb. 83). Kommt es zu einer Eisenlimitation schwindet der Anteil an freiem Häm und es kommt zur Repression durch Irr. Infolgedessen findet keine Aktivierung von *iscR* mehr statt und es gibt weniger IscR Protein.

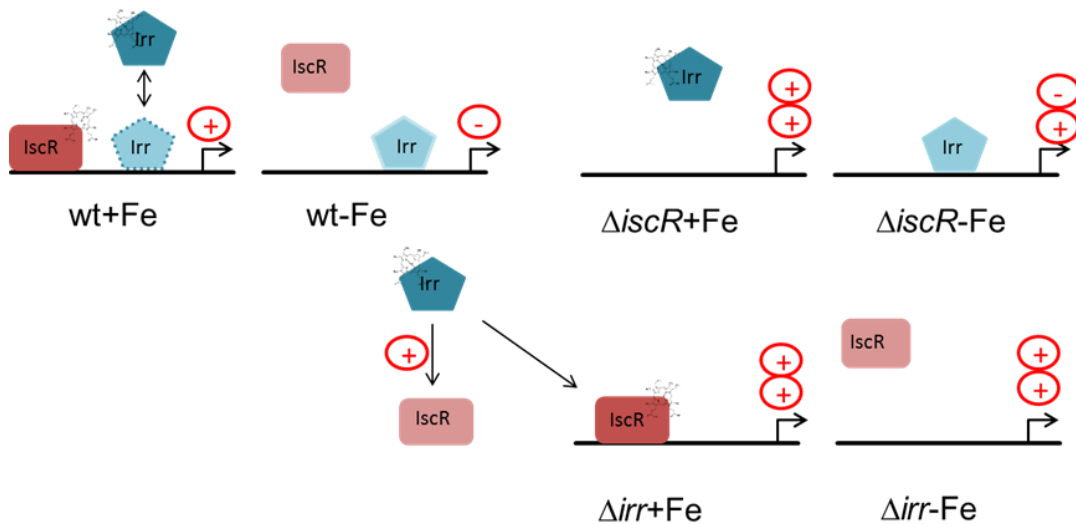


Abb. 83: Modell der Regulation des *iscR* Gens durch die Regulatoren IscR und Irr. In rot dargestellt ist die *holo*-IscR Form mit gebundenem Häm, in rosa die *apo*-IscR Form ohne Kofaktor, in blau die *holo*-Irr Form mit gebundenem Häm und in hellblau die *apo*-Irr Form ohne Kofaktor. Die Pfeile markieren die potentiellen Transkriptstartpunkte. Induzierte Genexpression ist mit einem „+“ gekennzeichnet und Repression mit einem „-“.

In dem $\Delta iscR$ Mutantenstamm fehlt der IscR Regulator vollständig und der Irr Regulator kann in Anwesenheit von Eisen das freie Häm binden was zu einer starken De-Repression führt. Unter Eisenlimitierenden Bedingungen bindet Irr an die ICE Box und es kommt zur Repression (Abb. 83). Im Δirr Mutantenstamm ist der direkte Einfluss von Irr auf IscR zu beobachten. Durch das Fehlen von Irr erhöht sich die Expression von *iscR* und somit die Menge an IscR Regulator. Dadurch kommt es in Anwesenheit von Eisen zu einer verstärkten Aktivierung durch IscR im Δirr Mutantenstamm, die sich in einer β -Galaktosidase Aktivität von 3526 Miller Units zeigt und über die maximale Aktivität im Wildtypstamm hinausgeht. In Abwesenheit von Eisen findet im Δirr Mutantenstamm keine Repression statt (Abb. 83).

Um diese komplexe Regulation im Detail zu untersuchen, wurden weitere Promotorfragmente erstellt, in denen jeweils die IscR Bindestelle bzw. Irr Bindestelle in dem 195 mer *iscR-lacZ* Reportergenkonstrukt mutiert wurde (Abb. 84). In dem Fragment Mut_1 wurde das Guanin/Adenin Motiv gegen ein Cytosin/Cytosin Motiv und das Thymin/Cytosin Motiv ebenfalls gegen ein Cytosin/Cytosin Motiv ausgetauscht. Diese veränderte Basenabfolge führt zum Verlust der potentiellen IscR Bindestelle.

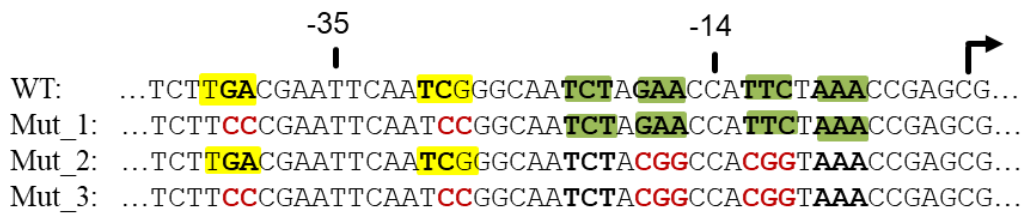


Abb. 84: Übersicht der eingefügten Mutationen in den *iscR* Promotor. Dargestellt ist ein Ausschnitt des *iscR* Promotors. Die potentielle IscR Bindestelle ist gelb hinterlegt und die potentielle Irr Bindestelle grün. Mutierte Basen innerhalb der möglichen Bindestellen sind rot markiert. Das Fragment Mut_1 weist eine Mutation in der potentiellen IscR Bindestelle auf, das Fragment Mut_2 Mutationen in der potentiellen Irr Bindestelle und das Fragment Mut_3 weist Mutationen in beiden möglichen Bindestellen auf.

In dem Fragment Mut_2 wurden die Sequenzmotive Guanin/Adenin/Adenin und Thymin/Thymin/Cytosin gegen das Motiv Cytosin/Guanin/Guanin ausgetauscht und so die potentielle Irr Bindestelle mutiert. In dem Fragment Mut_3 wurden die Mutationen aus Mut_1 und Mut_2 zusammen in die Gensequenz eingefügt und auf diesem Wege sowohl die IscR Bindestelle als auch die Irr Bindestelle mutiert. Die β -Galaktosidase Aktivitäten der neuen, mutagenisierten *iscR* Promotorfragmente wurden sowohl im *D. shibae* Wildtypstamm als auch in dem Δirr Mutantenstamm und dem $\Delta iscR$ Mutantenstamm untersucht (Abb. 85).

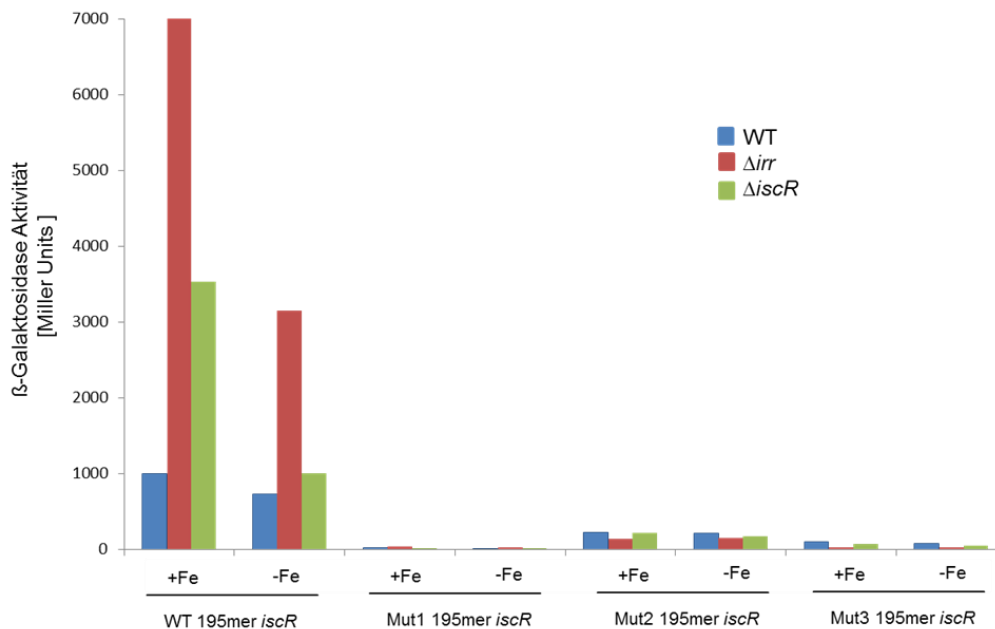


Abb. 85: β -Galaktosidase Aktivität des *iscR* Promotors mit eingefügten Mutationen. Es wurde ein 195 bp langes Fragment (WT 195mer *iscR*) des *iscR* Promotors gewählt und die Aktivität im *D. shibae* Wildtyp Stamm (blau) sowie in der Δ *iscR* Mutante (grün) und der Δ *irr* Mutante (rot) untersucht. Zusätzlich wurden noch die Fragmente Mut_1 (Mut1 195mer *iscR*), Mut_2 (Mut2 195mer *iscR*) und Mut_3 (Mut3 195mer *iscR*) untersucht. Dargestellt ist der Median der β -Galaktosidase Aktivität aus drei biologischen Replikaten, von denen jeweils drei technische Replikate vermessen worden sind. Die Proben wurden in SWM Medium mit (+Fe) bzw. ohne (-Fe) 15 μ M FeSO₄ angezogen, nach 16 h Inkubation bei 30 °C mit

einem Probenvolumen von 250 µl abgenommen und ein β-Galaktosidase Assay durchgeführt. Die β-Galaktosidase Aktivität wurde in Miller Units aufgetragen

Weder im *D. shibae* Wildtypstamm noch in dem Δirr bzw. $\Delta iscR$ Mutantenstamm konnte mit den mutagenisierten Konstrukten β-Galaktosidase Aktivität gemessen werden. Die eingeführte Mutation in der potentiellen IscR Bindestelle liegt im Bereich der -35 Region in Bezug zum potentiellen Transkriptstart, während die eingeführte Mutation in der potentiellen Irr Bindestelle im Bereich der -14 Region in Bezug zum potentiellen Transkriptstart liegt. Beide Bereiche sind wichtig für die Bindung der RNA-Polymerase. Die vorgenommene Mutagenese könnte dazu geführt haben, dass die RNA Polymerase ebenfalls nicht mehr korrekt binden kann. Ohne gebundene Polymerase kann keine Expression stattfinden.

Die Aktivität des IscR Regulators aus *D. shibae* wird möglicherweise über Häm als Kofaktor reguliert. In Anwesenheit von Eisen bindet IscR Häm und nimmt Einfluss auf die Expression von *irpA*, *Dshi_0575*, *iscR* und *hemB2*. Daher sollte mit Hilfe der *irpA-LacZ*, *hemB2-lacZ*, *iscR-lacZ*, *Dshi_0575-lacZ* sowie der *exbB-lacZ* Reportergenfusion im *D. shibae* Wildtypstamm untersucht werden, ob nicht nur Eisen, sondern auch Häm einen Einfluss auf die Expression hat. In dem verwendeten SWM Medium wurde entweder ein Eisengehalt von 15 µM FeSO₄ eingestellt (+Fe) oder auf die Zugabe von Eisen ins Medium verzichtet (-Fe). Um Häm als Signalmolekül zu untersuchen wurde anstelle von FeSO₄, Hämin in einer Konzentration von 20 mmol/l als einzige Eisenquelle zugegeben und die β-Galaktosidase Aktivität gemessen.

Der *irpA* Promotor im *D. shibae* Wildtypstamm zeigt eine Eisenmangel Induktion durch den Anstieg von 188 Miller Units in Anwesenheit von Eisen auf 7600 Miller Units in Abwesenheit von Eisen. Durch die Zugabe von Hämin als einzige verfügbare Eisenquelle aus dem Medium, ist eine nahezu identische Induktion von 7550 Miller Units zu erkennen (Abb. 86). Diese Induktion der Expression von *irpA* in Anwesenheit von Häm deutet darauf hin, dass Häm nicht als Signalmolekül für die Anwesenheit von Eisen dient. Der IscR Regulator bindet unter Eisenmangel an den Promotorbereich von *irpA*, was zur Aktivierung der Genexpression führt. Die Bindung von Häm an den IscR Regulator in Anwesenheit von Eisen sollte diese Induktion verhindern. Interessanterweise ist dies nicht der Fall, daher scheint Häm keinen Einfluss auf die Bindung von IscR an den Promotorbereich von *irpA* zu haben. Ein ähnliches Ergebnis ist für den *exbB* Promotor zu beobachten gewesen. Auch hier kann Hämin nicht als Signalmolekül dienen.

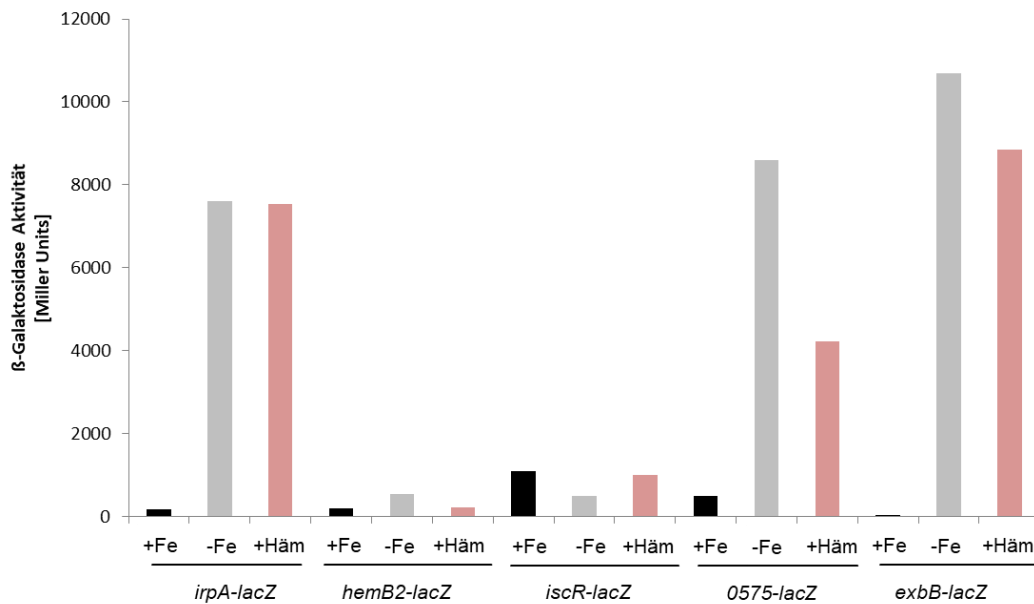


Abb. 86: β -Galaktosidase Aktivität verschiedener Promotoren in Abhängigkeit von Hämin. Es wurden die Fragmente des *irpA*, *hemB2*, *iscR*, *Dshi_0575* und *exbB* Promotors erneut im *D. shibae* Wildtypstamm vermessen. Dargestellt ist der Median der β -Galaktosidase Aktivität aus drei biologischen Replikaten, von denen jeweils drei technische Replikate vermessen worden sind. Die mittlere Abweichung vom Median ist gekennzeichnet und liegt unter 10 %. Die Proben wurden in SWM Medium mit (schwarz) bzw. ohne (grau) 15 μ M FeSO_4 sowie mit 20 mmol/L Hämin (rot) als Eisenquelle angezogen, nach 16 h Inkubation bei 30 °C mit einem Probenvolumen von 250 μ l abgenommen und ein β -Galaktosidase Assay durchgeführt. Die β -Galaktosidase Aktivität wurde in Miller Units aufgetragen.

Die gemessene β -Galaktosidase Aktivität der *hemB2* Reporterengenfusion in Anwesenheit von Eisen betrug 192 Miller Units. Unter Eisenmangel stieg die β -Galaktosidase Aktivität auf 547 Miller Units. Zugabe von Hämin ins Medium ergab lediglich 220 Miller Units (Abb. 86). Häm könnte als Kofaktor von IscR gebunden werden und IscR reprimiert die Expression der *hemB2* Reporterengenfusion.

In Anwesenheit von Eisen wurde für die *iscR* Reporterengenfusion eine β -Galaktosidase Aktivität von 1100 Miller Units gemessen. Unter Eisenmangel konnte nur eine β -Galaktosidase Aktivität von 500 Miller Units gemessen werden. Durch die Zugabe von Hämin wurden 1000 Miller Units gemessen (Abb. 86). IscR könnte Häm als Kofaktor binden und so in Anwesenheit von Eisen durch Bindung an den *iscR* Promotorbereich die Genexpression aktivieren. Ebenso könnte der Irr Regulator Häm binden und zu einer De-Repression der Genexpression führen.

Die Betrachtung der Ergebnisse für die *Dshi_0575* Reporterengenfusion zeigte eine β -Galaktosidase Aktivität von 8600 Miller Units unter Eisenmangel verglichen mit 500 Miller Units in Anwesenheit von Eisen. Nach der Zugabe von Hämin ins Medium konnte eine β -Galaktosidase Aktivität von 4220 Miller Units gemessen werden (Abb. 86). Der IscR

Regulator aktiviert unter Eisenmangel die Genexpression von *Dshi_0575* ähnlich wie bei *irpA*. Kommt es zur Bindung von Häm als Kofaktor durch IscR kann keine Aktivierung mehr stattfinden. Für das Gen *Dshi_0575* wurde in den vorangegangenen Experimenten ein durch Fur vermittelter Einfluss von RirA auf die Genexpression neben dem Einfluss von IscR ermittelt. Da der Fur Regulator den Gehalt an Eisen direkt über die Verfügbarkeit von Fe^{2+} misst, kann dieser bedingte Einfluss von Häm erklärt werden. Dies gibt Hinweise darauf, dass für die Regulation der *Dshi_0575* Genexpression sowohl Eisen als auch Häm als Signalmoleküle benötigt werden.

4.7.6 Eisenabhängiges Regulationsnetzwerk von *D. shibae*

Um ein Gesamtbild der eisenabhängigen Genregulation bei *D. shibae* in einem Regulationsnetzwerk darzustellen, wurden alle in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse in einem Model zusammengefasst. Sowohl die Transkriptomanalysen als auch die Expressionsstudien mittels Reportergenfusionen zeigten, dass viele eisenabhängig regulierten Gene in *D. shibae*, wie beispielsweise das eisenabhängige Gencluster durch eine Zusammenspiel der vier eisenabhängigen Regulatoren RirA, IscR, Fur und Irr von *D. shibae* reguliert werden. Dieses Zusammenspiel wurde im Detail für die eisenabhängige Regulation der Genexpression des *hemB2* Gens sowie des *Dshi_0575-hmuSTUV* Operon, des *irpA* Operon sowie des *iscR-suf* Operon betrachtet.

Durch die Transkriptomanalyse mittels DNA-Array und RNA Sequenzierung konnte in Abwesenheit von Eisen eine *apo*-Fur-abhängige Induktion des *rirA* Gens beobachtet werden (Abb. 87, grün). Im Promotorbereich des *rirA* Gens wurde zudem eine Fur Box mit dem Sequenzmotiv 5'-TGC-N₉-GCA-3' identifiziert. Durch biochemische und physikalische Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der RirA Regulator aus *D. shibae* ein $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$ Cluster als Kofaktor bindet und darüber den verfügbaren Eisengehalt in der Zelle messen kann (Abb. 87, rot). Durch Expressionsanalysen mit einem *hemB2-lacZ* Reportergenkonstrukt konnte gezeigt werden, dass RirA in Anwesenheit von Eisen als Repressor wirkt. Durch Footprint und EMSA Analysen wurde gezeigt, dass *holo*-RirA an den Promotorbereich des *hemB2* Gens bindet. Hierbei ist die Bindung von der Koordination des $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$ Clusters abhängig. Darüber hinaus wurde im *hemB2* Promotorbereich eine neue Bindestelle für den RirA Regulator mit dem Motiv 5'-TTAA-N₁₀-AATT-3' identifiziert. Ebenfalls als Repressor reguliert *holo*-RirA die Genexpression des *Dshi_0575* Gens, dem ersten Gen des *hmu* Operon. Im Promotorbereich von *Dshi_0575* wurde die als Bindestelle für den RirA Regulator postulierte IRO Box mit

dem Sequenzmotiv 5'-TGA-N₉-TCA-3' gefunden (Rodionov *et al.*, 2006). Neben der *holo*-RirA Repressor Funktion wurde durch eine *irpA-lacZ* Reporterengenfusion eine aktivierende Funktion von *apo*-RirA auf die *irpA* Genexpression gezeigt (Abb. 87, rot). Im Promotorbereich von *irpA* wurde ebenfalls eine IRO Box als potentielle Bindestelle für RirA gefunden.

Zusätzlich zu der RirA abhängigen Regulation wurde auch ein Einfluss durch den IscR Regulator beobachtet (Abb. 87, gelb). Biochemische Analysen zeigten, dass der IscR Regulator aus *D. shibae* in der Lage ist ein Häm als Kofaktor zu binden und über dieses den verfügbaren Eisengehalt in der Zelle zu messen. Sowohl die Transkriptomanalysen als auch die Reporterengenfusionen zeigten drei verschiedene Modelle der Regulation durch IscR. Vergleichbar mit dem RirA Regulator aktiviert *apo*-IscR unter Eisenmangel die Genexpression des *irpA* sowie *Dshi_0575* Gens.

Reporterengenfusionen mit den Promotorbereichen des Gens *hemB2* zeigten, dass in Anwesenheit von Eisen *holo*-IscR die Genexpression reprimiert. Im Promotorbereich des *irpA*, *hemB2* und *Dshi_0575* Gens wurde zudem jeweils eine potentielle IscR Bindestelle mit dem Motiv 5'-GA-N₉-TC-3' gefunden, die in leicht abgewandelter Form der Iron Rhodo Box entspricht, die bereits in anderen Alphaproteobakterien als IscR Bindestelle definiert worden ist (Rodionov *et al.*, 2006). Die Bindestelle 5'-GA-N₉-TC-3' wurde speziell auch als Bindestelle für IscR regulierte Gene in *R. sphaeroides* identifiziert (Remes *et al.*, 2015). Die dritte Form der Regulation, die für den IscR Regulator gefunden wurde, war die *holo*-IscR Aktivierung in Anwesenheit von Eisen. Hier zeigte die Expressionsanalyse einer *iscR-lacZ* Reporterengenfusionen, dass *holo*-IscR in Anwesenheit von Eisen die Genexpression von *iscR* aktiviert (Abb. 87, gelb). Die Bindung von IscR an seinen eigenen Promotorbereich wurde auch in EMSA Analysen gezeigt. Zudem wurde eine potentielle IscR Bindestelle mit dem Motiv 5'-GA-N₉-TC-3' gefunden. Da das *iscR* Gen den Start des *suf* Operons bildet, welches für die Fe-S Cluster Biogenese verantwortlich ist, nimmt der IscR Regulator durch seine Autoregulation direkt Einfluss auf die Verfügbarkeit von Fe-S Clustern. Hierdurch ist ein indirekter Einfluss auch auf die Funktion von RirA zu beobachten, da *holo*-RirA ein [3Fe-4S]¹⁺ benötigt. Neben dem Einfluss von IscR auf die Genexpression des *iscR-suf* Operons, wurde auch ein Einfluss des Irr Regulators auf die Expression der *iscR-lacZ* Reporterengenfusion gefunden (Abb. 87, blau).

Der Promotorbereich des *iscR* Gens weist eine potentielle Irr Bindestelle, die ICE Box, mit der konservierten Erkennungssequenz 5'-TCT-N-GAA-N₃-TTC-N-AAA-3' auf. In Abwesenheit von Eisen bindet *apo*-Irr an die ICE Box und reprimiert die Genexpression. In Anwesenheit von Eisen kommt es durch die Bindung von Häm zu einer Degradation des Irr Proteins und zu einer De-Repression der Genexpression.

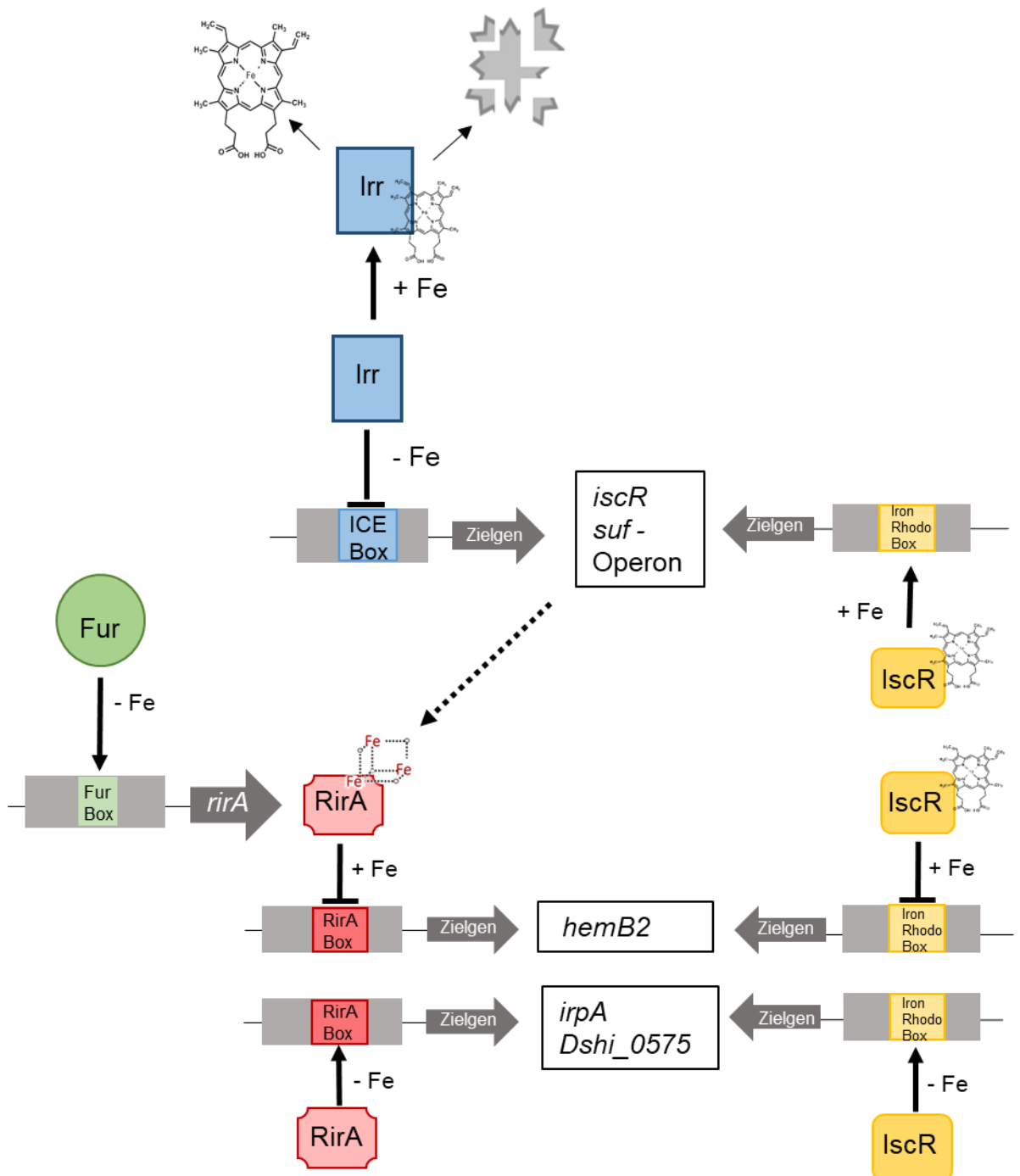


Abb. 87: Modell der Regulation der Gene *Dshi_0575*, *irpA*, *hemb2* und *iscR* durch die Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR

Dieses eisenabhängige Regulationsnetzwerk zeigt das komplexe Zusammenspiel der vier eisenabhängigen Regulatoren von *D. shibae* mit teils hierarchischem Aufbau. Die Regulation der eisenabhängigen Genexpression erfolgt dabei oft im Zusammenspiel zweier Regulatoren. Die Eisenverfügbarkeit in der Zelle wird zum einen durch die Koordination eines $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ Cluster und zum anderen über einen Häm-Kofaktor wahrgenommen. Dabei kommt es durch die Regulation der Expression des *iscR-suf* Operon durch IscR und Irr, zusätzlich über die Steuerung der Fe-S Biogenese zum Einfluss auf den RirA Regulator.

Dieses Zusammenspiel der Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR ist bis zu diesem Zeitpunkt einzigartig innerhalb der Alphaproteobakterien. Eine Regulation der eisenabhängig regulierten Gene durch zwei bzw. drei Regulatoren konnte schon öfter gezeigt werden. In Rhizobien zum Beispiel wird die eisenabhängige Genregulation hauptsächlich durch den Irr Regulator und den RirA Regulator gesteuert (Hibbing & Fuqua, 2011). Das *hmu* Operon sowie das *suf* Operon werden in Anwesenheit von Eisen durch *holo*-RirA reprimiert. Der Irr Regulator hingegen reprimiert in Abwesenheit von Eisen das *irpA* Operon und das *suf* Operon in Rhizobien (Johnston *et al.*, 2007). Oftmals werden zusätzlich auch Gene gefunden, die für einen Fur bzw. Mur Regulator codieren (Rodionov *et al.*, 2006). In den *Rhodobacteraceae*n werden häufig Gene gefunden, die für den Fur Regulator, den Irr Regulator und den IscR Regulator codieren und die eisenabhängige Genregulation regulieren (Rodionov *et al.*, 2006). In *R. sphaeroides* beispielsweise wird das *irpA* Operon ebenso wie das *iscR-suf*-Operon durch IscR und Irr reguliert (Remes *et al.*, 2015; Peuser *et al.*, 2012). Für den Fur Regulator hingegen wurde nur ein sekundärer Einfluss auf die Genexpression eisenabhängig regulierter Gene gefunden (Rodionov *et al.*, 2006).

Die Regulation der Eisenanpassung durch vier eisenabhängige Regulatoren war bislang unbekannt. Daraus ergibt sich ein komplexes Zusammenspiel der Regulatoren bei der Regulation einzelner Gene in *D. shibae*, was in dieser Art bislang noch nicht gezeigt worden ist.

5. Zusammenfassung

In dem marinen Bakterium *D. shibae* wurden die vier transkriptionellen Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR identifiziert und deren Rolle bei der Anpassung an Eisenmangel untersucht. Hierbei wurde speziell die Expression der eisenabhängig-induzierten Gene untersucht, die für die Aufnahme, den Transport und den Einbau von Eisen im Metabolismus verantwortlich sind.

Vergleichende Wachstumsanalysen zeigten eine Abhängigkeit der Anpassung an Eisenmangel von den Regulatoren IscR und RirA. Durch Transkriptomanalysen mittels DNA Array und RNA Sequenzierung konnte im *D. shibae* Wildtypstamm DFL12^T ein eisenabhängiges Gencluster identifiziert werden, das Gene und Operons beinhaltet, die für Proteine der Eisenaufnahme codieren. Nach Vergleich der Transkriptmengen aus dem Wildtypstamm und den Regulatormutantenstämmen zeigte der IscR Regulator den stärksten Einfluss auf die Gene der Eisenadaptation. Verschiedene Reportergenfusionen mit Promotorbereichen eisenabhängig regulierter Gene wie *hemB2*, *iscR*, *irpA*, oder *Dshi_0575* zeigten darüber hinaus eine Ko-Regulation von IscR mit den Regulatoren RirA und Irr. Fur spielt hingegen nur eine untergeordnete Rolle in der Anpassung an Eisenmangel, jedoch aktiviert Fur eisenunabhängig die Expression des *rirA* Gens.

Durch die biochemische Charakterisierung mittels UV/Vis Spektroskopie, ESR und Mössbauer Analysen des RirA Regulators konnte ein Sauerstoff labiles [3Fe-4S]¹⁺ Cluster als Kofaktor identifiziert werden. Die zyklische Voltammetrie Messung zeigte zudem, dass das [3Fe-4S]¹⁺ Cluster nicht am Transport von Elektronen beteiligt ist und somit redox-inaktiv ist. Durch eine ortsgerichtete Mutagenese konnten die drei Cysteine an Position 91, 99 und 105 als Liganden für die Koordination des [3Fe-4S]¹⁺ identifiziert werden. Electro Mobility Shift Assays zeigten die Notwendigkeit eines intakten [3Fe-4S]¹⁺ Clusters für die Bindung des RirA Proteins an den *hemB2* Promotorbereich. In Kombination mit Footprintanalysen konnte zudem im *hemB2* Promoter eine Bindestelle mit dem Sequenzmotiv 5'-TTAA-N₁₀-AATT-3' identifiziert werden. Erste Kristallisationsansätze mit RirA aus *D. shibae* zeigten mit kleinen Kristallen Erfolge.

Der IscR Regulator aus *D. shibae* hingegen bindet anders als in anderen Organismen kein Fe-S Cluster als Kofaktor sondern ein Häm. Dies konnte durch Hämintitrationen, und UV/Vis sowie ESR Spektroskopie untersucht werden. Zusätzlich zeigten Electro Mobility Shift Assays, dass die Bindung von IscR an die Promotorbereiche des *iscR* und *hemB2* Gens unabhängig von dem gebundenen Kofaktor stattfinden.

6. Summary

Four transcriptional regulators, Fur, Irr, IscR and RirA, were identified in the marine bacterium *D. shibae* and their role in the adaptation during iron deficiency was examined. The study focused on the expression of iron-independent genes responsible for iron uptake, transport and utilization.

Compared growth analyses showed a dependency of adaptation on iron deficiency for the regulators IscR and RirA. An iron-dependent gene cluster was identified in the *D. shibae* wild type DFL12^T through transcriptome analyses *via* DNA array and RNA sequencing. Genes and operons found in this cluster code for iron uptake proteins. A comparison between the amount of measured transcripts of the wild type strain and the mutant strains Δfur , Δirr , $\Delta rirA$ and $\Delta iscR$, indicated that regulator IscR has the greatest impact on the genes of iron adaptation. Furthermore, various reporter gene fusions with promotor regions of iron dependent regulating genes like *hemB2*, *iscR*, *irpA*, and *Dshi_0575* showed a co-regulation of IscR with regulators RirA and Irr. The Fur regulator of *D. shibae* plays a minor role in the adaptation to iron limitation, though Fur regulates iron-independently the expression of *rirA*.

The biochemical characterization of the RirA regulator, using UV/Vis and EPR spectroscopy as well as Mössbauer analyses, revealed an oxygen labile $[3Fe-4S]^{1+}$ cluster as a cofactor. The determination of iron content by AAS supported this result. Furthermore, cyclic voltammetry measurements showed a redox inactive cluster, not involved in electron transport. The Cysteines at position 91, 99 and 105 were identified as ligands for the coordination of the $[3Fe-4S]^{1+}$ cluster through side directed mutagenesis. Electro mobility shift assays showed the importance of an intact $[3Fe-4S]^{1+}$ cluster for DNA binding to the promoter region of *hemB2*. In combination with footprint analyses, the motif 5'-TTAA-N₁₀-AATT-3' within the *hemB2* promotor was identified as the binding site of RirA. First crystallization attempts were performed, which resulted in small crystals.

In contrast to other organisms, the IscR regulator from *D. shibae* does not bind a Fe-S cluster as a cofactor but a heme. This was shown in UV/ Vis and EPR spectroscopy and by heme titration and heme binding experiments. Additionally, electro mobility shift assays of the anaerobically purified IscR protein revealed that binding to the promoter regions of the *iscR* and *hemB2* gene takes place independently of the bound cofactor.

7. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einzelne Promotorregionen durch Promoter-*lacZ* Reporterfusionen untersucht und potentielle Bindestellen für RirA, IscR und Irr identifiziert. Um die Repression bzw. Aktivierung durch die Regulatoren nach Bindung an die Bindestellen besser zu verstehen ist es nötig die Transkriptionsstartpunkte der relevanten eisenabhängig regulierten Gene z. B. durch Primer Extension Experimente zu identifizieren.

Die Ko-Regulation über mehrere Transkriptionsregulatoren könnte durch weitere Promoter-Reporterfusionen mit eingefügten Mutationen in den potentiellen Bindestellen analysiert werden. Zusätzlich könnten weitere Protein/DNA Bindungsexperimente durchgeführt werden um die Bindestellen genauer zu definieren und den Einfluss von Mutationen in den Bindemotiven auf die Regulator/DNA Interaktion zu untersuchen.

Um die Kristallstruktur des RirA Proteins zu lösen, könnten Verfeinerungen der Kristallisationsbedingungen durchgeführt werden, bei denen bereits kleine Kristalle gefunden wurden, um größere Kristalle zu erhalten. Eine weitere Möglichkeit wären Seeding Experimente, bei denen die bereits vorhandenen Kristalle als Keime in neue Kristallisationsansätze eingesetzt werden.

Die Koordination des in dieser Arbeit identifizierten Häm Kofaktors von IscR könnte untersucht werden, indem potentielle Liganden wie Histidinreste durch ortsgerichtete Mutagenese gegen Alanin ausgetauscht werden und die Affinität zu Häm untersucht wird. Weitere ESR Experimente sowie Mössbauer Analysen mit ^{57}Fe -markiertem Hämin könnten ebenfalls Informationen über den Einbau des Ko-Faktors liefern. Sollte IscR Protein in ausreichenden Mengen produziert und gereinigt werden können, sollten Kristallisationsexperimente mit und ohne Hämin unternommen werden. Footprintanalysen des IscR Proteins in seiner *apo*- und *holo*-Form mit verschiedenen Promotorfragmenten IscR regulierter Gene, könnte Aufschluss darüber geben, ob die Bindung mit und ohne Hämin an verschiedene Bereiche des Promotors stattfindet.

8. Literaturverzeichnis

Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research (2018): Iron Fertilization Of Oceans: A Real Option For Carbon Dioxide Reduction? Online verfügbar unter <https://www.sciencedaily.com/releases/2007/06/070608142214.htm>, zuletzt aktualisiert am 28.11.2018, zuletzt geprüft am 29.11.2018.

Aliverti, Alessandro; Hagen, Wilfred R.; Zanetti, Giuliana (1995): Direct electrochemistry and EPR spectroscopy of spinach ferredoxin mutants with modified electron transfer properties. In: *FEBS letters* 368 (2), S. 220–224. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00648-S.

Beinert, H.; Holm, R. H.; Münck, E. (1997): Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. In: *Science (New York, N.Y.)* 277 (5326), S. 653–659.

Beinert, H.; Thomson, A. J. (1983): Three-iron clusters in iron-sulfur proteins. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 222 (2), S. 333–361.

Bergquist, B. A.; Boyle, E. A. (2006): Dissolved iron in the tropical and subtropical Atlantic Ocean. In: *Global Biogeochem. Cycles* 20 (1), n/a-n/a. DOI: 10.1029/2005GB002505.

Bhubhanil, Sakkarin; Niamyim, Phettree; Sukchawalit, Rojana; Mongkolsuk, Skorn (2014): Cysteine desulphurase-encoding gene *sufS2* is required for the repressor function of *RirA* and oxidative resistance in *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Microbiology (Reading, England)* 160 (Pt 1), S. 79–90. DOI: 10.1099/mic.0.068643-0.

Biebl, Hanno; Allgaier, Martin; Tindall, Brian J.; Koblizek, Michal; Lünsdorf, Heinrich; Pukall, Rüdiger; Wagner-Döbler, Irene (2005): *Dinoroseobacter shibae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55 (Pt 3), S. 1089–1096. DOI: 10.1099/ij.s.0.63511-0.

Bienz, Stefan; Bigler, Laurent; Fox, Thomas; Meier, Herbert (2016): 1.5 Derivativ-Spektroskopie. In: Manfred Hesse, Herbert Meier, Bernd Zeeh, Stefan Bienz, Laurent Bigler und Thomas Fox (Hg.): *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 9., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Boyd, P. W.; Ellwood, M. J. (2010): The biogeochemical cycle of iron in the ocean. In: *Nature Geosci* 3 (10), S. 675–682. DOI: 10.1038/ngeo964.

Braun, V.; Hantke, K.; Köster, W. (1998): Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. In: *Metal ions in biological systems* 35, S. 67–145.

Braun, Volkmar (2003): Iron uptake by *Escherichia coli*. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8, s1409-21.

Braun, Volkmar (2009): FhuA (TonA), the Career of a Protein ∇ . In: *Journal of bacteriology* 191 (11), S. 3431–3436. DOI: 10.1128/JB.00106-09.

- Buck, Kristen N.; Lohan, Maeve C.; Berger, Carolyn J. M.; Bruland, Kenneth W. (2007): Dissolved iron speciation in two distinct river plumes and an estuary: Implications for riverine iron supply. In: *Limnol. Oceanogr.* 52 (2), S. 843–855. DOI: 10.4319/lo.2007.52.2.0843.
- Carpenter, Chandra; Payne, Shelley M. (2014): Regulation of iron transport systems in Enterobacteriaceae in response to oxygen and iron availability. In: *Journal of inorganic biochemistry* 133, S. 110–117. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2014.01.007.
- Chiancone, Emilia; Ceci, Pierpaolo; Ilari, Andrea; Ribacchi, Frederica; Stefanini, Simo-
netta (2004): Iron and proteins for iron storage and detoxification. In: *Biomaterials* 17 (3),
S. 197–202. DOI: 10.1023/B:BIOM.0000027692.24395.76.
- Dayer, Mohammad Reza; Moosavi-Movahedi, Ali Akbar; Dayer, Mohammad Saaid (2010): Band assignment in hemoglobin porphyrin ring spectrum: using four-orbital model of Gouterman. In: *Protein and peptide letters* 17 (4), S. 473–479.
- Deckwer, Wolf-Dieter; Pühler; Schmid, Rolf D. (1999): RÖMPP Lexikon Biotechnologie und Gentechnik. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Dormann, E. (1995): ESR-Spektroskopie. In: Dietrich Haarer und Hans Wolfgang Spiess (Hg.): *Spektroskopie amorpher und kristalliner Festkörper*. Heidelberg: Steinkopff, S. 29–51.
- Douglas, Rousseau G.; Rousseau, Denis L. (1992): Hydrogen bonding of iron-coordinated histidine in heme proteins. In: *Journal of structural biology* 109 (1), S. 13–17. DOI: 10.1016/1047-8477(92)90062-F.
- Drescher, Malte; Jeschke, Gunnar; Bordignon, Enrica (2012): EPR spectroscopy. Applications in chemistry and biology. Berlin: Springer (Topics in current chemistry, 321). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-28347-5>.
- Eldridge, M. L.; Trick, C. G.; Alm, M. B.; DiTullio, G. R.; Rue, E. L.; Bruland, K. W. et al. (2004): Phytoplankton community response to a manipulation of bioavailable iron in HNLC waters of the subtropical Pacific Ocean. In: *Aquat. Microb. Ecol.* 35, S. 79–91. DOI: 10.3354/ame035079.
- Feliciello, I.; Chinali, G. (1993): A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from Escherichia coli. In: *Analytical biochemistry* 212 (2), S. 394–401. DOI: 10.1006/abio.1993.1346.
- Fleischhacker, Angela S.; Stubna, Audria; Hsueh, Kuang-Lung; Guo, Yisong; Teter, Sarah J.; Rose, Justin C. et al. (2012): Characterization of the 2Fe-2S cluster of Escherichia coli transcription factor IscR. In: *Biochemistry* 51 (22), S. 4453–4462. DOI: 10.1021/bi3003204.
- Giel, Jennifer L.; Nesbit, April D.; Mettert, Erin L.; Fleischhacker, Angela S.; Wanta, Brendan T.; Kiley, Patricia J. (2013): Regulation of iron-sulphur cluster homeostasis through transcriptional control of the Isc pathway by 2Fe-2S-IscR in Escherichia coli. In: *Molecular microbiology* 87 (3), S. 478–492. DOI: 10.1111/mmi.12052.

- Gledhill, Martha; Buck, Kristen N. (2012): The Organic Complexation of Iron in the Marine Environment: A Review. In: *Frontiers in Microbiology* 3. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00069.
- Gruner, Ines; Frädriich, Claudia; Böttger, Lars H.; Trautwein, Alfred X.; Jahn, Dieter; Härtig, Elisabeth (2011): Aspartate 141 is the fourth ligand of the oxygen-sensing 4Fe-4S₂⁺ cluster of *Bacillus subtilis* transcriptional regulator Fnr. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (3), S. 2017–2021. DOI: 10.1074/jbc.M110.191940.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. In: *Biochemical Journal* 219 (1), S. 1–14.
- Hamza, I.; Chauhan, S.; Hassett, R.; O'Brian, M. R. (1998): The bacterial irr protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (34), S. 21669–21674.
- Hannibal, Luciana; Collins, Daniel; Brassard, Julie; Chakravarti, Ritu; Vempati, Rajesh; Dorlet, Pierre et al. (2012): Heme binding properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: *Biochemistry* 51 (43), S. 8514–8529. DOI: 10.1021/bi300863a.
- Hantke, K. (2001): Iron and metal regulation in bacteria. In: *Current opinion in microbiology* 4 (2), S. 172–177.
- Hibbing, Michael E.; Fuqua, Clay (2011): Antiparallel and interlinked control of cellular iron levels by the Irr and RirA regulators of *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Journal of bacteriology* 193 (14), S. 3461–3472. DOI: 10.1128/JB.00317-11.
- Hider, Robert C.; Kong, Xiaole (2010): Chemistry and biology of siderophores. In: *Natural product reports* 27 (5), S. 637–657. DOI: 10.1039/b906679a.
- Hoang, T. T.; Karkhoff-Schweizer, R. R.; Kutchma, A. J.; Schweizer, H. P. (1998): A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. In: *Gene* 212 (1), S. 77–86.
- Holtzhauer, Martin (1996): Methoden in der Proteinanalytik. Berlin, Heidelberg: Springer. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-61422-4>.
- Jacobs, Jenny (unveröffentlichte Daten). Eisenaufnahme in *Dinoroseobacter shibae*. Dissertation. Technische Universität Carolo Wilhelmina, TU Braunschweig. Institut für Mikrobiologie.
- Jang, Soojin; Imlay, James A. (2010): Hydrogen peroxide inactivates the *Escherichia coli* Isc iron-sulphur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. In: *Molecular microbiology* 78 (6), S. 1448–1467. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07418.x.
- Jickells, T. D.; An, Z. S.; Andersen, K. K.; Baker, A. R.; Bergametti, G.; Brooks, N. et al. (2005): Global iron connections between desert dust, ocean biogeochemistry, and climate. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5718), S. 67–71. DOI: 10.1126/science.1105959.

- Johnson, Deborah C.; Dean, Dennis R.; Smith, Archer D.; Johnson, Michael K. (2005): Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. In: *Annual review of biochemistry* 74, S. 247–281. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133518.
- Johnson, Kenneth S.; Coale, Kenneth H.; Elrod, Virginia A.; Tindale, Neil W. (1994): Iron photochemistry in seawater from the equatorial Pacific. In: *Marine Chemistry* 46 (4), S. 319–334. DOI: 10.1016/0304-4203(94)90029-9.
- Johnston, Andrew W. B.; Todd, Jonathan D.; Curson, Andrew R.; Lei, Sun; Nikolaidou-Katsaridou, Nefeli; Gelfand, Mikhail S.; Rodionov, Dmitry A. (2007): Living without Fur: the subtlety and complexity of iron-responsive gene regulation in the symbiotic bacterium *Rhizobium* and other α -proteobacteria. In: *BioMetals* 20 (3), S. 501–511. DOI: 10.1007/s10534-007-9085-8.
- Johnstone, Timothy C.; Nolan, Elizabeth M. (2015): Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. In: *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* 44 (14), S. 6320–6339. DOI: 10.1039/c4dt03559c.
- Katzke, Nadine; Arvani, Solmaz; Bergmann, René; Circolone, Franco; Markert, Annette; Svensson, Vera et al. (2010): A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. In: *Protein expression and purification* 69 (2), S. 137–146. DOI: 10.1016/j.pep.2009.08.008.
- Khoroshilova, N.; Beinert, H.; Kiley, P. J. (1995): Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (7), S. 2499–2503.
- Kleiner, Denise (unveröffentlichte Daten): Definition des eisenabhängigen Dshi_0575 Promotors aus *Dinoroseobacter shibae* durch lacZ Reporterfusion und DNA-Bindestudien mit dem IscR Regulator. Masterarbeit. Technische Universität Carolo Wilhelmina, Braunschweig. Institut für Mikrobiologie.
- Kommineni, Sushma; Lama, Amrita; Popescu, Benjamin; Nakano, Michiko M. (2012): Global transcriptional control by NsrR in *Bacillus subtilis*. In: *Journal of bacteriology* 194 (7), S. 1679–1688. DOI: 10.1128/JB.06486-11.
- Kovach, M. E.; Elzer, P. H.; Hill, D. S.; Robertson, G. T.; Farris, M. A.; Roop, R. M.; Peterson, K. M. (1995): Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. In: *Gene* 166 (1), S. 175–176.
- Krewulak, Karla D.; Vogel, Hans J. (2008): Structural biology of bacterial iron uptake. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (9), S. 1781–1804. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.07.026.
- Kühl, Toni; Wißbrock, Amelie; Goradia, Nishit; Sahoo, Nirakar; Galler, Kerstin; Neugebauer, Ute et al. (2013): Analysis of Fe(III) heme binding to cysteine-containing heme-regulatory motifs in proteins. In: *ACS chemical biology* 8 (8), S. 1785–1793. DOI: 10.1021/cb400317x.

- Kühner, Melanie; Haufschildt, Kristin; Neumann, Alexander; Storbeck, Sonja; Streif, Judith; Layer, Gunhild (2014): The alternative route to heme in the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri*. In: *Archaea (Vancouver, B.C.)* 2014, S. 327637. DOI: 10.1155/2014/327637.
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H. et al. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (21), S. 2947–2948. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- Lau, Cheryl K. Y.; Krewulak, Karla D.; Vogel, Hans J. (2016): Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. In: *FEMS microbiology reviews* 40 (2), S. 273–298. DOI: 10.1093/femsre/fuv049.
- Lee, Jin-Won; Helmann, John D. (2007): Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. In: *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 20 (3-4), S. 485–499. DOI: 10.1007/s10534-006-9070-7.
- Liu, Xuewu; Millero, Frank J. (2002): The solubility of iron in seawater. In: *Marine Chemistry* 77 (1), S. 43–54. DOI: 10.1016/S0304-4203(01)00074-3.
- Mademidis, A.; Killmann, H.; Kraas, W.; Flechsler, I.; Jung, G.; Braun, V. (1997): ATP-dependent ferric hydroxamate transport system in *Escherichia coli*: periplasmic FhuD interacts with a periplasmic and with a transmembrane/cytoplasmic region of the integral membrane protein FhuB, as revealed by competitive peptide mapping. In: *Molecular microbiology* 26 (5), S. 1109–1123.
- Massé, Eric; Arguin, Méline (2005): Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. In: *Trends in biochemical sciences* 30 (8), S. 462–468. DOI: 10.1016/j.tibs.2005.06.005.
- Mettert, Erin L.; Kiley, Patricia J. (2015): How Is Fe-S Cluster Formation Regulated? In: *Annual review of microbiology* 69, S. 505–526. DOI: 10.1146/annurev-micro-091014-104457.
- Miller, Jeffrey H. (1972): Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miller, M. J.; Gennis, R. B. (1983): The purification and characterization of the cytochrome d terminal oxidase complex of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. In: *The Journal of biological chemistry* 258 (15), S. 9159–9165.
- Molitor, Bastian; Stassen, Marc; Modi, Anuja; El-Mashtoly, Samir F.; Laurich, Christoph; Lubitz, Wolfgang et al. (2013): A heme-based redox sensor in the methanogenic archaeon *Methanosarcina acetivorans*. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (25), S. 18458–18472. DOI: 10.1074/jbc.M113.476267.
- Nakajima, Hiroshi; Takatani, Nobuyuki; Yoshimitsu, Kyohei; Itoh, Mitsuko; Aono, Shigetoshi; Takahashi, Yasuhiro; Watanabe, Yoshihito (2010): The role of the Fe-S

- cluster in the sensory domain of nitrogenase transcriptional activator VnfA from *Azotobacter vinelandii*. In: *The FEBS journal* 277 (3), S. 817–832. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07530.x.
- Nakano, Michiko M.; Geng, Hao; Nakano, Shunji; Kobayashi, Kazuo (2006): The nitric oxide-responsive regulator NsrR controls ResDE-dependent gene expression. In: *Journal of bacteriology* 188 (16), S. 5878–5887. DOI: 10.1128/JB.00486-06.
- Neilands, J. B. (1995): Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (45), S. 26723–26726.
- Noinaj, Nicholas; Guillier, Maude; Barnard, Travis J.; Buchanan, Susan K. (2010): TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. In: *Annual review of microbiology* 64, S. 43–60. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134247.
- Ollinger, Juliane; Song, Kyung-Bok; Antelmann, Haike; Hecker, Michael; Helmann, John D. (2006): Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*. In: *Journal of bacteriology* 188 (10), S. 3664–3673. DOI: 10.1128/JB.188.10.3664-3673.2006.
- Outten, F. Wayne; Djaman, Ouliana; Storz, Gisela (2004): A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. In: *Molecular microbiology* 52 (3), S. 861–872. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04025.x.
- Pandelia, Maria-Eirini; Nitschke, Wolfgang; Infossi, Pascale; Giudici-Orticoni, Marie-Thérèse; Bill, Eckhard; Lubitz, Wolfgang (2011): Characterization of a unique FeS cluster in the electron transfer chain of the oxygen tolerant NiFe hydrogenase from *Aquifex aeolicus*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (15), S. 6097–6102. DOI: 10.1073/pnas.1100610108.
- Pellicer Martinez, Ma Teresa; Martinez, Ana Bermejo; Crack, Jason C.; Holmes, John D.; Svistunenko, Dimitri A.; Johnston, Andrew W. B. et al. (2017): Sensing iron availability via the fragile 4Fe-4S cluster of the bacterial transcriptional repressor RirA. In: *Chemical science* 8 (12), S. 8451–8463. DOI: 10.1039/c7sc02801f.
- Peuser, Verena; Remes, Bernhard; Klug, Gabriele (2012): Role of the Irr protein in the regulation of iron metabolism in *Rhodobacter sphaeroides*. In: *PloS one* 7 (8), e42231. DOI: 10.1371/journal.pone.0042231.
- Qi, Zhenhao; Hamza, Iqbal; O'Brian, Mark R. (1999): Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23), S. 13056–13061.
- Rajagopalan, Senapathy; Teter, Sarah J.; Zwart, Petrus H.; Brennan, Richard G.; Phillips, Kevin J.; Kiley, Patricia J. (2013): Studies of IscR reveal a unique mechanism for metal-dependent regulation of DNA binding specificity. In: *Nature structural & molecular biology* 20 (6), S. 740–747. DOI: 10.1038/nsmb.2568.
- Reddy, K. J.; Bullerjahn, G. S.; Sherman, D. M.; Sherman, L. A. (1988): Cloning, nucleotide sequence, and mutagenesis of a gene (irpA) involved in iron-deficient growth

of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. In: *J. Bacteriol.* 170 (10), S. 4466–4476. DOI: 10.1128/jb.170.10.4466-4476.1988.

Reents, Heike; Gruner, Ines; Harmening, Ute; Böttger, Lars H.; Layer, Gunhild; Heathcote, Peter et al. (2006): *Bacillus subtilis* Fnr senses oxygen via a 4Fe-4S cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state. In: *Molecular microbiology* 60 (6), S. 1432–1445. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05198.x.

Remes, Bernhard; Eisenhardt, Benjamin D.; Srinivasan, Vasundara; Klug, Gabriele (2015): IscR of *Rhodobacter sphaeroides* functions as repressor of genes for iron-sulfur metabolism and represents a new type of iron-sulfur-binding protein. In: *MicrobiologyOpen* 4 (5), S. 790–802. DOI: 10.1002/mbo3.279.

Rennhack, Kim Eileen (2017): Heterologe Produktion, Charakterisierung und Mutagenese des eisenabhängigen Regulators IscR aus *Dinoroseobacter shibae*. Masterarbeit. Technische Universität Carolo Wilhelmina, TU Braunschweig. Institut für Mikrobiologie.

Rodionov, Dmitry A.; Gelfand, Mikhail S.; Todd, Jonathan D.; Curson, Andrew R. J.; Johnston, Andrew W. B. (2006): Computational reconstruction of iron- and manganese-responsive transcriptional networks in alpha-proteobacteria. In: *PLoS computational biology* 2 (12), e163. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0020163.

Rudolph, Gesine; Hennecke, Hauke; Fischer, Hans-Martin (2006): Beyond the Fur paradigm: iron-controlled gene expression in rhizobia. In: *FEMS microbiology reviews* 30 (4), S. 631–648. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00030.x.

Sambrook, Joseph; Russell, David William (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos, Joana A.; Alonso-García, Noelia; Macedo-Ribeiro, Sandra; Pereira, Pedro José Barbosa (2014): The unique regulation of iron-sulfur cluster biogenesis in a Gram-positive bacterium. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (22), E2251–60. DOI: 10.1073/pnas.1322728111.

Santos, Joana A.; Pereira, Pedro José Barbosa; Macedo-Ribeiro, Sandra (2015): What a difference a cluster makes: The multifaceted roles of IscR in gene regulation and DNA recognition. In: *Biochimica et biophysica acta* 1854 (9), S. 1101–1112. DOI: 10.1016/j.bbapap.2015.01.010.

Schubert, Erik; Florin, Nicole; Duthie, Fraser; Henning Brewitz, H.; Kühl, Toni; Imhof, Diana et al. (2015): Spectroscopic studies on peptides and proteins with cysteine-containing heme regulatory motifs (HRM). In: *Journal of inorganic biochemistry* 148, S. 49–56. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2015.05.008.

Schwartz, C. J.; Giel, J. L.; Patschkowski, T.; Luther, C.; Ruzicka, F. J.; Beinert, H.; Kiley, P. J. (2001): IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (26), S. 14895–14900. DOI: 10.1073/pnas.251550898.

- Schwiesow, Leah; Mettert, Erin; Wei, Yahan; Miller, Halie K.; Herrera, Natalia G.; Balderas, David et al. (2018): Control of hmu Heme Uptake Genes in *Yersinia pseudotuberculosis* in Response to Iron Sources. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00047.
- Seo, Sang Woo; Kim, Donghyuk; Latif, Haythem; O'Brien, Edward J.; Szubin, Richard; Palsson, Bernhard O. (2014): Deciphering Fur transcriptional regulatory network highlights its complex role beyond iron metabolism in *Escherichia coli*. In: *Nature communications* 5, S. 4910. DOI: 10.1038/ncomms5910.
- Shepard, William; Soutourina, Olga; Courtois, Emmanuelle; England, Patrick; Haouz, Ahmed; Martin-Verstraete, Isabelle (2011): Insights into the Rrf2 repressor family--the structure of CymR, the global cysteine regulator of *Bacillus subtilis*. In: *The FEBS journal* 278 (15), S. 2689–2701. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08195.x.
- Skrabal, Peter M. (2009): Spektroskopie. Eine methodenübergreifende Darstellung vom UV- bis zum NMR-Bereich. Zürich: vdf Hochschulverl. (UTB Chemie, Naturwissenschaften, Medizin, 8355). Online verfügbar unter http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=2967440&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm.
- Small, Sandra K.; Puri, Sumant; O'Brian, Mark R. (2008): Heme-dependent metalloregulation by the Iron Response Regulator (Irr) Protein in *Rhizobium* and other Alpha-Proteobacteria. In: *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 22 (1), S. 89–97. DOI: 10.1007/s10534-008-9192-1.
- Sunda, William G. (2012): Feedback Interactions between Trace Metal Nutrients and Phytoplankton in the Ocean. In: *Frontiers in Microbiology* 3. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00204.
- Takahashi, Y.; Nakamura, M. (1999): Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. In: *Journal of biochemistry* 126 (5), S. 917–926.
- Takahashi, Yasuhiro; Tokumoto, Umechiyo (2002): A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (32), S. 28380–28383. DOI: 10.1074/jbc.C200365200.
- Tam, Ming F.; Rice, Natalie W.; Maillett, David H.; Simplaceanu, Virgil; Ho, Nancy T.; Tam, Tsuey Chyi S. et al. (2013): Autoxidation and oxygen binding properties of recombinant hemoglobins with substitutions at the α Val-62 or β Val-67 position of the distal heme pocket. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (35), S. 25512–25521. DOI: 10.1074/jbc.M113.474841.
- TEALE, F. W. (1959): Cleavage of the haem-protein link by acid methylethylketone. In: *Biochimica et biophysica acta* 35, S. 543.
- Thoma, Sabrina; Schobert, Max (2009): An improved *Escherichia coli* donor strain for diparental mating. In: *FEMS microbiology letters* 294 (2), S. 127–132.
- Todd, Jonathan D.; Sawers, Gary; Rodionov, Dmitry A.; Johnston, Andrew W. B. (2006): The *Rhizobium leguminosarum* regulator IrrA affects the transcription of a wide

- range of genes in response to Fe availability. In: *Molecular genetics and genomics* : MGG 275 (6), S. 564–577. DOI: 10.1007/s00438-006-0115-y.
- Todd, Jonathan D.; Wexler, Margaret; Sawers, Gary; Yeoman, Kay H.; Poole, Philip S.; Johnston, Andrew W. B. (2002): *RirA*, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum*. In: *Microbiology (Reading, England)* 148 (Pt 12), S. 4059–4071. DOI: 10.1099/00221287-148-12-4059.
- Vargas, C.; McEwan, A. G.; Downie, J. A. (1993): Detection of c-type cytochromes using enhanced chemiluminescence. In: *Analytical biochemistry* 209 (2), S. 323–326. DOI: 10.1006/abio.1993.1127.
- Varnado, Cornelius L.; Goodwin, Douglas C. (2004): System for the expression of recombinant hemoproteins in *Escherichia coli*. In: *Protein expression and purification* 35 (1), S. 76–83. DOI: 10.1016/j.pep.2003.12.001.
- Voget, Sonja; Göker, Markus; Brinkhoff, Thorsten (2014): Genomik: Grundlage zum Verständnis des Erfolgs von *Roseobacter*-Gruppe. In: *Biospektrum* 20 (3), S. 279–282. DOI: 10.1007/s12268-014-0441-2.
- Wagner-Döbler, Irene; Ballhausen, Britta; Berger, Martine; Brinkhoff, Thorsten; Buchholz, Ina; Bunk, Boyke et al. (2010): The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. In: *The ISME journal* 4 (1), S. 61–77. DOI: 10.1038/ismej.2009.94.
- Wagner-Döbler, Irene; Biebl, Hanno (2006): Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. In: *Annual review of microbiology* 60, S. 255–280. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142115.
- Yang, Jianhua; Ishimori, Koichiro; O'Brian, Mark R. (2005): Two heme binding sites are involved in the regulated degradation of the bacterial iron response regulator (*Irr*) protein. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (9), S. 7671–7676. DOI: 10.1074/jbc.M411664200.
- Yeoman, K. H.; Curson, A. R. J.; Todd, J. D.; Sawers, G.; Johnston, A. W. B. (2004): Evidence that the *Rhizobium* regulatory protein *RirA* binds to cis-acting iron-responsive operators (IROs) at promoters of some Fe-regulated genes. In: *Microbiology (Reading, England)* 150 (Pt 12), S. 4065–4074. DOI: 10.1099/mic.0.27419-0.
- Yin, Liang; Bauer, Carl E. (2013): Controlling the delicate balance of tetrapyrrole biosynthesis. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 368 (1622), S. 20120262. DOI: 10.1098/rstb.2012.0262.
- Yukl, Erik T.; Elbaz, Mohamed A.; Nakano, Michiko M.; Moënné-Loccoz, Pierre (2008): Transcription Factor *NsrR* from *Bacillus subtilis* Senses Nitric Oxide with a 4Fe-4S Cluster (†). In: *Biochemistry* 47 (49), S. 13084–13092. DOI: 10.1021/bi801342x.

9. Anhang

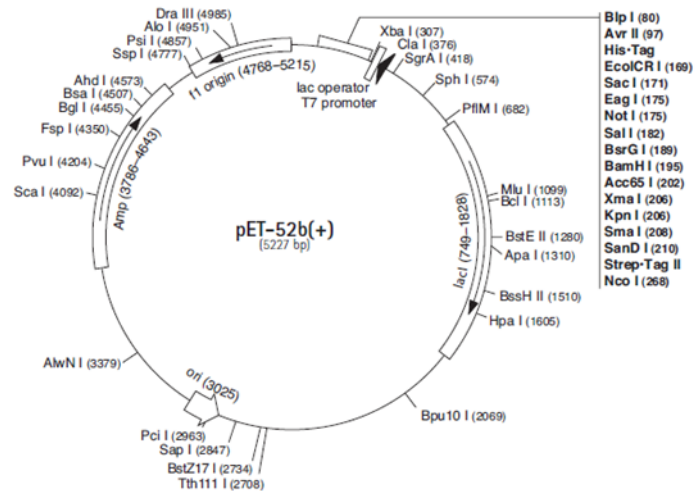


Abb. 88: Vektorkarte des pET-52b(+) Vektors von Novagen. Der Vektor beinhaltet eine Ampicillin Resistenzkassette, einen T7 Promotor sowie eine „multiple cloning site“ durch die Gene mit N-terminalem Strep-Tag oder C-terminalem His-Tag in den Vektor kloniert werden können.

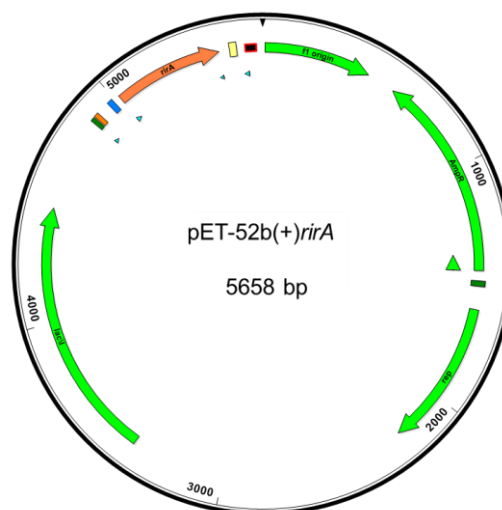


Abb. 89: Vektorkarte des klonierten pET-52b(+)*rirA* Vektors. Das Gen *rirA* mit einer Größe von 431 bp wurde über die Schnittstellen XmaI und SacI-HF mit einem N-terminalem Strep-Tag in den Vektor kloniert.

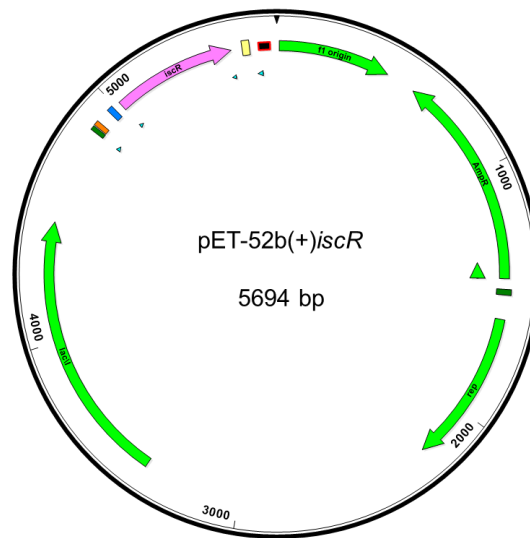


Abb. 90: Vektorkarte des klonierten pET-52b(+)*iscR* Vektors. Das Gen *iscR* mit einer Größe von 467 bp wurde über die Schnittstellen *Xma*I und *Sac*I-HF mit einem N-terminalem Strep-Tag in den Vektor kloniert.

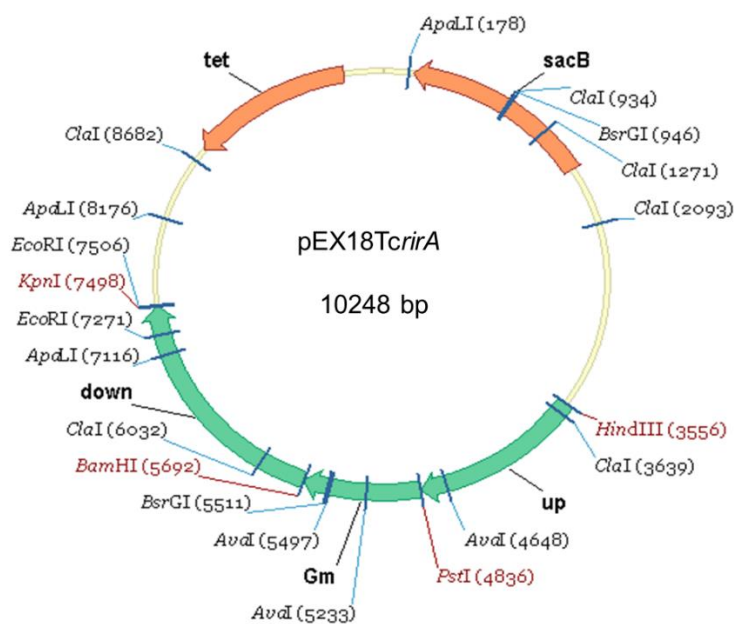


Abb. 91: Vektorkarte des klonierten suicide Vektors pEX18Tc zur Erstellung einer *rirA* Deletionsmutante. Der suicide Vektor pEX18Tc besitzt eine eigene Tetracyclin Resistenzkassette (*tet*) und verfügt über diverse Schnittstellen. Eine Gentamicin Resistenzkassette (*Gm*) mit fusionierten Upstream (*up*) und downstream (*down*) Bereichen des *rirA* Gens wurden über Schnittstellen in den Vektor kloniert zur Deletion des *rirA* Gens im *D. shibae* DFL12^T Wildtyp Stamm.

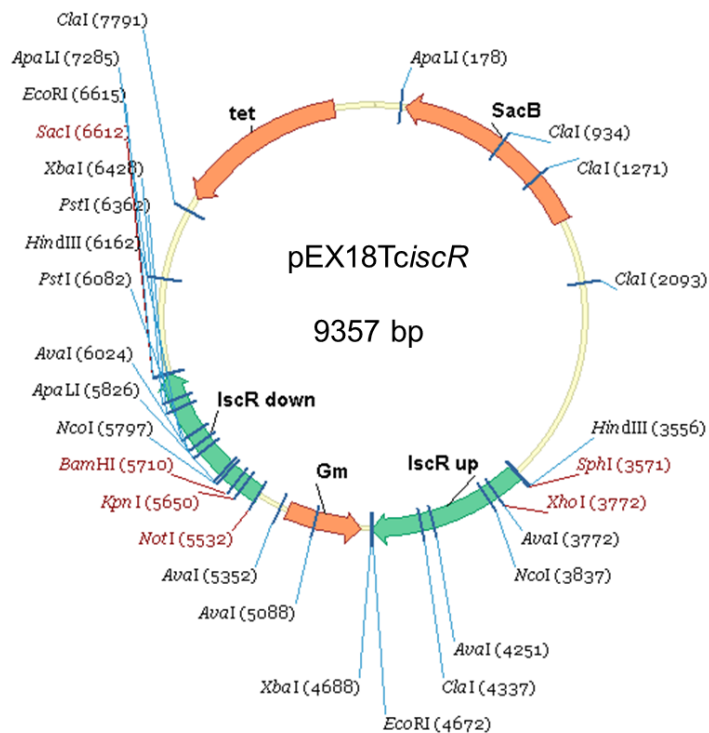


Abb. 92: Vektorkarte des klonierten suicide Vektors pEX18Tc zur Erstellung einer *iscR* Deletionsmutante. Der suicide Vektor pEX18Tc besitzt eine eigene Tetracyclin Resistenzkassette (tet) und verfügt über diverse Schnittstellen. Eine Gentamicin Resistenzkassette (Gm) mit fusionierten Upstream (IscR up) und downstream (IscR down) Bereichen des *rirA* Gens wurden über Schnittstellen in den Vektor kloniert zur Deletion des *iscR* Gens im *D. shibae* DFL12^T Wildtyp Stamm.

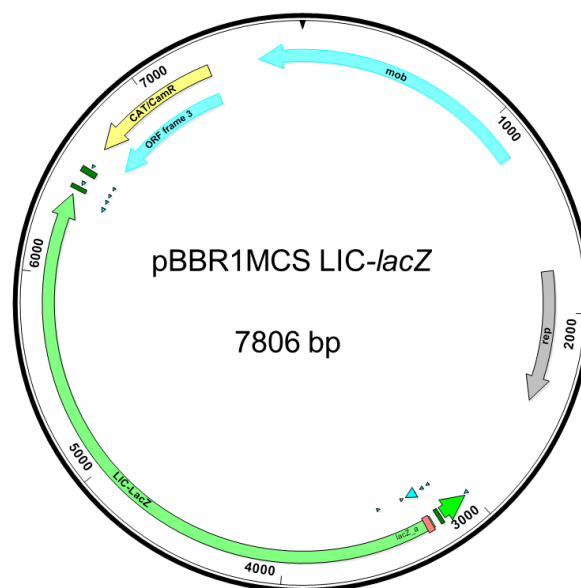


Abb. 93: Vektorkarte des pBBR1MCS Vektors zur Erstellung von Reportergenfusionen. Über die ligationsunabhängige Klonierung (LIC) wurden Fragmente verschiedener Promotorbereiche über die *Sma*I Schnittstelle vor das *lacZ* Gen kloniert.

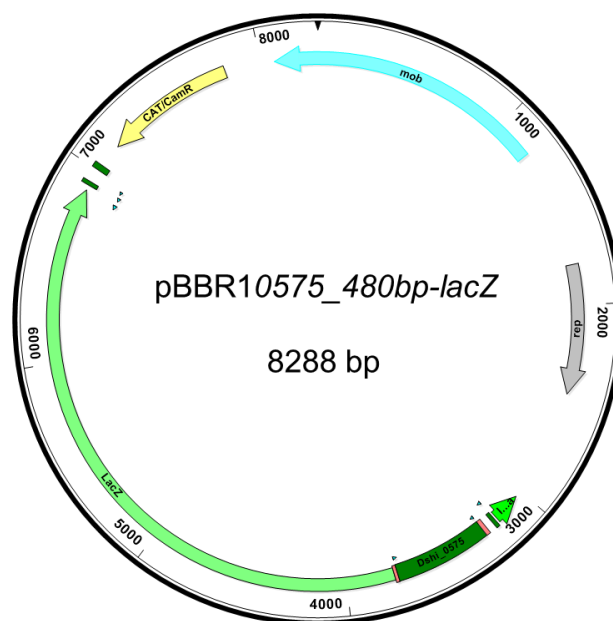


Abb. 94: Vektorkarte des pBBR10575_480 bp-*lacZ* Vektors. In den Vektor pBBR1MCS wurde über ligationsunabhängige Klonierung mittels der *Sma*I Schnittstelle ein 480 bp langes Promotorfragment des Gens *Dshi_0575* vor das *lacZ* Gen kloniert.

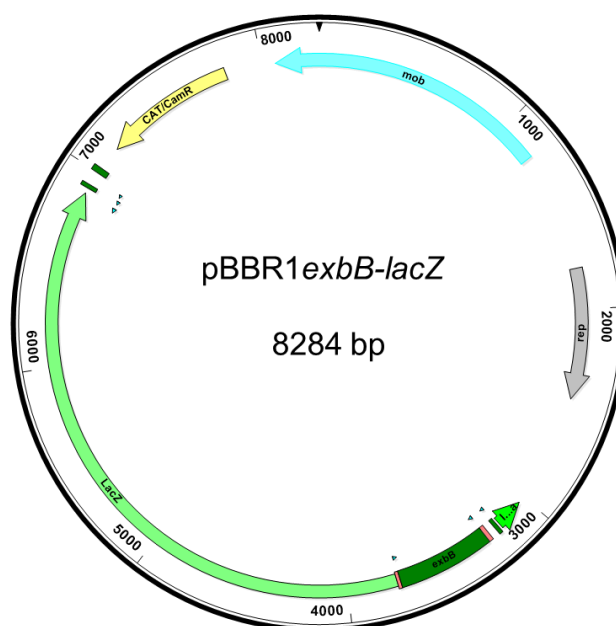


Abb. 95: Vektorkarte des pBBR1exbB-*lacZ* Vektors. In den Vektor pBBR1MCS wurde über ligationsunabhängige Klonierung mittels der *Sma*I Schnittstelle ein 472 bp langes Promotorfragment des Gens *exbB* vor das *lacZ* Gen kloniert.

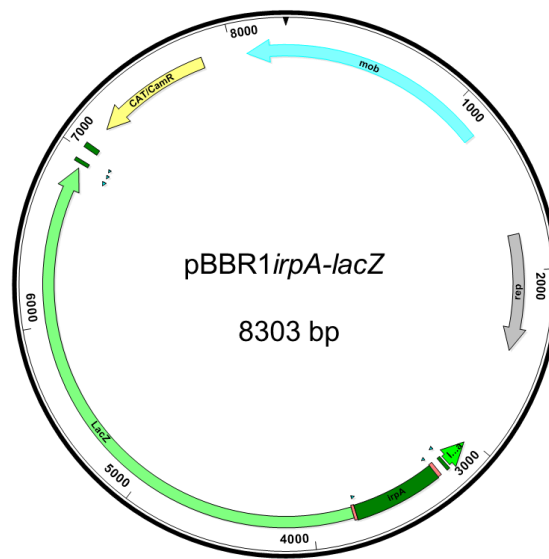


Abb. 96: Vektorkarte des pBBR1*irpA-lacZ* Vektors. In den Vektor pBBR1MCS wurde über ligationsunabhängige Klonierung mittels der *Sma*I Schnittstelle ein 491 bp langes Promotorfragment des Gens *irpA* vor das *lacZ* Gen kloniert.

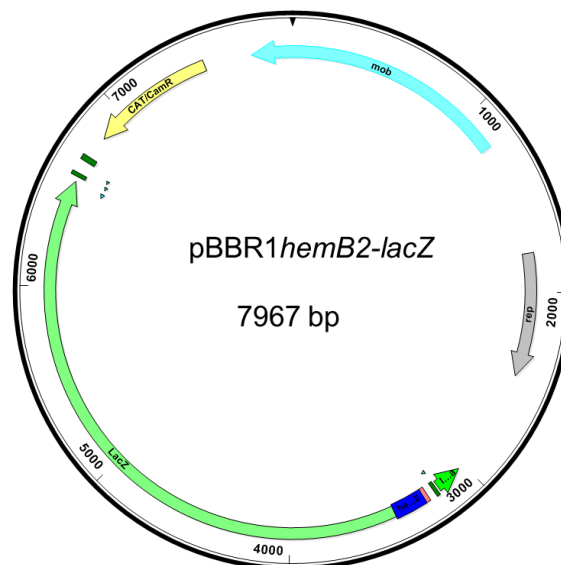


Abb. 97: Vektorkarte des pBBR1*hemB2-lacZ* Vektors. In den Vektor pBBR1MCS wurde über ligationsunabhängige Klonierung mittels der *Sma*I Schnittstelle ein 155 bp langes Promotorfragment des Gens *hemB2* vor das *lacZ* Gen kloniert.

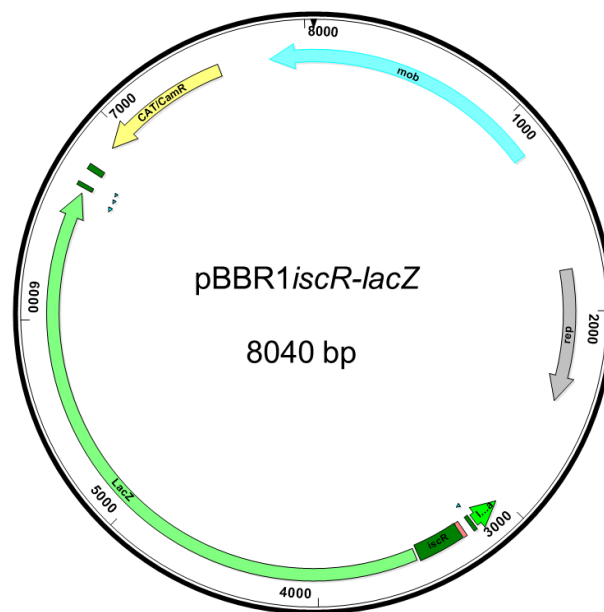


Abb. 98: Vektorkarte des pBBR1*iscR-lacZ* Vektors. In den Vektor pBBR1MCS wurde über ligationsunabhängige Klonierung mittels der *Sma*I Schnittstelle ein 195 bp langes Promotorfragment des Gens *iscR* vor das *lacZ* Gen kloniert.

Tabelle 26: Übersicht der eingesetzten Mengen an Fe-Ammoniumcitrat und Lithiumsulfid für die Rekonstitution von RirA

Protein- menge [μ M]	Fe-Ammoni- umcitrat [μ M]	Lithiumsul- fid [μ M]	Inkubations- zeit [Min]	Ergebnis
100	500	500	5	Eisensulfid, Protein ist ausgefallen
100	100	100	5	Eisensulfid, Protein ist ausgefallen
100	50	50	5	Eisensulfid, Protein ist ausgefallen
100	10	10	60	Nichts passiert
100	500	100	5	Eisensulfid, Protein fällt aus
100	500	10	5	Eisensulfid, Protein fällt aus
100	100	500	5	Eisensulfid, Protein ist ausgefallen
100	10	500	5	Nichts passiert
100	50	200	5	Eisensulfid, Protein ist ausgefallen
200	500	500	5	Eisensulfid, Protein ist ausgefallen
200	100	100	5	Eisensulfid, Protein ist ausgefallen
200	50	50	5	Eisensulfid, Protein ist ausgefallen
200	10	10	60	Nichts passiert
200	500	100	5	Eisensulfid, Protein fällt aus
200	500	10	5	Eisensulfid, Protein fällt aus
200	100	500	5	Eisensulfid, Protein ist ausgefallen
200	10	500	5	Nichts passiert
200	50	200	5	Eisensulfid, Protein ist ausgefallen

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über die Eisenverfügbarkeit im Meer.	1
Abb. 2: Übersicht der Verteilung der einzelnen Mitglieder der Roseobacter Gruppe. .	3
Abb. 3: Mikroskopische und Makroskopische Betrachtung des marinen Bakterium <i>D. shibae</i> .	4
Abb. 4: Wachstumskurven des DFL12 ^T Wildtypstamms.	5
Abb. 5: Schematische Übersicht möglicher Eisenaufnahmesystem in Bakterien.	6
Abb. 6: Schematische Darstellung der Fur Regulation.	8
Abb. 7: Schematische Darstellung der Irr Regulation.	9
Abb. 8: Schematische Darstellung der RirA Regulation.	10
Abb. 9: Schematische Darstellung der IscR Regulation.	11
Abb. 10: Prinzip der Multiplex PCR zur Überprüfung von Doppelcrossover und Single Crossover Ereignissen.	38
Abb. 11: Vektorübersicht für die Ligationsunabhängige Klonierung.	40
Abb. 12: Prinzip der LIC Klonierung.	41
Abb. 13: Aufbau der Messungen von Redoxpotentialen mittels Zyklischer Voltammetrie.	67
Abb. 14: Form einer verwendeten 96-Well-Platte nach dem „Sitting Drop“ Verfahren.	78
Abb. 15: Venn Diagramm der unter Eisenmangel induzierten Gene in drei gemessenen <i>D. shibae</i> Wildtyp Ansätzen.	81
Abb. 16: Schematische Darstellung der Operonstruktur der mit am stärksten induzierten Gene im DNA Array.	83
Abb. 17: Alignment von Aminosäuresequenzen zur Identifikation des Proteins Dshi_1660.	89
Abb. 18: Alignment von Aminosäuresequenzen zur Identifikation des Proteins Dshi_1633.	90
Abb. 19: Die Produktion von StrepII-RirA in <i>E. coli</i> BL21CD+(DE3)-RIL Zellen nach Induktion mit verschiedenen IPTG Konzentrationen bei verschiedenen Temperaturen.	93
Abb. 20: Westernblotanalysen von produziertem StrepII-RirA in <i>E. coli</i> BL21CD+(DE3)-RIL Zellen nach Induktion mit 100 µM IPTG	

bei 17 °C und 25 °C.	94
Abb. 21: Heterologe Produktion und anaerobe Reinigung des StrepII-RirA Fusionsproteins.	95
Abb. 22: Vergleich Puffer und anaerob gereinigtes StrepII-RirA..	96
Abb. 23: Vergleich der StrepII-RirA Produktionen bei 17 °C und 25 °C.	97
Abb. 24: Zerfall des Fe-S Clusters durch Sauerstoffexposition im zeitlichen Verlauf einer UV/Vis Messung.	98
Abb. 25: ESR Spektrum von <i>D. shibae</i> StrepII-RirA weist auf ein [3Fe-4S] ¹⁺ Cluster als Kofaktor hin.	100
Abb. 26: Temperaturabhängige ESR Spektren von <i>D. shibae</i> StrepII-RirA weisen auf ein [3Fe-4S] ¹⁺ Cluster als Kofaktor hin.	101
Abb. 27: UV/Vis und ESR Spektren des gereinigten StrepII-RirA aus <i>E. coli</i> Produktionszellen mit zusätzlichem ISC oder SUF System.	102
Abb. 28: UV/Vis Spektren zweier ausgewählter Rekonstitutionsexperimente.	103
Abb. 29: UV/Vis Spektren des StrepII-RirA Proteins nach der chemischen Reduktion.	104
Abb. 30: ESR und CV Spektren des StrepII-RirA Proteins zur Ermittlung des Reduktionspotentials.	105
Abb. 31: <i>In vivo</i> Mössbauer Spektren des gereinigten StrepII-RirA Proteins.	108
Abb. 32: Rhombische Form des [3Fe-4S] ¹⁺ Clusters von RirA.	109
Abb. 33: ESR Spektren des StrepII-RirA Proteins nach Zugabe zwei-wertiger Ionen.	109
Abb. 34: AAS Spektrum des anaerob gereinigten StrepII-RirA Proteins zur Bestimmung des Eisengehalts.	110
Abb. 35: Bestimmung des Schwefelgehalts in der StrepII-RirA Probe.	111
Abb. 36: Sequenzalignment verschiedener RirA Proteine innerhalb der Alphaproteobakterien.	112
Abb. 37: UV/Vis Spektren des RirA Proteins nach Austausch der Cysteine durch Alanine <i>via</i> ortsgerichteter Mutagenese.	113
Abb. 38: Analytische Gelpermeationschromatographie von StrepII-RirA und den Cystein Mutanten.	114
Abb. 39: Oligonukleotidsequenz des 155 mers für Gelretardationsanalysen.	116
Abb. 40: Gelretardationsanalyse des gereinigten StrepII-RirA mit dem DIG markierten 155 bp langen Fragment des <i>hemB2</i> Promoters.	117

Abb. 41: DNaseI Protektionsanalyse des codierenden und nicht-codierenden DNA Strangs des <i>hemB2</i> Promoterfragments mit anaerob gereinigtem StrepII-RirA Protein	119
Abb. 42: Gelretardationsanalyse des anaerob und aerob gereinigten StrepII-RirA mit dem DIG markiertem 41 bp langem Fragment des <i>hemB2</i> Promotors.	121
Abb. 43: Übersicht der verwendeten 41 mer Promoter Fragmente mit den eingeführten Mutationen.	122
Abb. 44: Gelretardationsanalyse des anaerob gereinigten StrepII-RirA mit dem DIG markiertem 41 bp langem Fragment des <i>hemB2</i> Promotors nach Insertion verschiedener Mutationen.	123
Abb. 45: Präzipitat des ausgefallenen RirA Proteins.	124
Abb. 46: Kristalline Strukturen des anaerob gereinigten RirA Proteins.	125
Abb. 47: Produktion und Reinigung des StrepII-IscR Fusionsproteins.	127
Abb. 48: UV/Vis spektroskopische Analyse von IscR vor und nach der Rekonstitution.	129
Abb. 49: Alignment von IscR Aminosäuresequenzen aus <i>D. shibae</i> und anderen Alphaproteobakterien.	130
Abb. 50: UV/Vis Spektren von IscR nach Zugabe unterschiedlicher Hämin Mengen.	131
Abb. 51: ESR Spektren von IscR und Hämin.	133
Abb. 52: Hämin Färbung von IscR aus <i>D. shibae</i> und Lysozym.	135
Abb. 53: Test der Hämin Bindung mittels Butanon Extraktion.	136
Abb. 54: UV/Vis Spektren der CP-Motiv Mutanten.	138
Abb. 55: ESR spektroskopische Analysen der CP Mutanten..	139
Abb. 56: Vergleich der UV/Vis Spektren von IscR mit und ohne Zugabe von Hämin zur Produktion.	141
Abb. 57: Promotorsequenz des <i>iscR</i> Gens.	142
Abb. 58: Gelretardationsanalyse des anaerob gereinigten IscR Proteins mit und ohne gebundenem Häm mit dem DIG markiertem 195 bp langem Fragment des <i>iscR</i> Promotors und mit einem 155 bp langem Fragment des <i>hemB2</i> Promotors.	143
Abb. 59: Schematische Darstellung der homologen Rekombination.	146
Abb. 60: Agarosegele der Multiplex PCR für <i>rirA</i> und <i>iscR</i> Deletionsmutanten.	147

Abb. 61: Wachstumskurven des DFL12 ^T Wildtypstamms, den Mutanten Δfur , Δirr , $\Delta rirA$, $\Delta iscR$ sowie den entsprechenden Komplementanten.	148
Abb. 62: Schematische Darstellung der Operonstruktur des SUF Genclusters in <i>D. shibae</i> .	151
Abb. 63: Fragmente für die Komplementation von $\Delta rirA$ mit eigenem oder konstitutivem Promoter.	152
Abb. 64: Wachstumskurven der Komplementanten von $\Delta rirA$ im Vergleich zur $\Delta rirA$ Deletionsmutante und dem DFL12 ^T Wildtyp.	153
Abb. 65: Westernblot Analyse des komplementierten RirA Regulators mit fusioniertem N- oder C-terminalem StrepII-Tag.	154
Abb. 66: Vergleich des <i>D. shibae</i> Wildtyps mit den Mutanten Δfur , Δirr , $\Delta rirA$ und $\Delta iscR$ bei der Kultivierung in Anwesenheit und Abwesenheit von Eisen.	155
Abb. 67: UV/Vis Spektren der Bakteriochlorophyll Extraktion.	156
Abb. 68: Schematische Darstellung des RirA Regulons.	159
Abb. 69: Schematische Darstellung des IscR Regulons.	164
Abb. 70: Iron Rhodo Box Motiv als potentielle Bindestelle für IscR.	165
Abb. 71: Schematische Darstellung des Fur Regulons.	169
Abb. 72: Sequenzmotiv der potentiellen Fur Bindestelle im Promotorbereich des <i>rirA</i> Gens.	170
Abb. 73: Schematische Darstellung des Irr Regulons.	179
Abb. 74: Vergleich der Expressionsstärke der Gene des eisenabhängig regulierten Genclusters unter Eisenmangel in den einzelnen Regulatormutanten mit der Wildtypexpression.	184
Abb. 75: β -Galaktosidase Aktivitäten der Promotoren <i>Dshi_0575</i> , <i>irpA</i> und <i>exbB</i> .	190
Abb. 76: β -Galaktosidase Aktivität der <i>Dshi_0575-lacZ</i> Reporterengenfusion	192
Abb. 77: Sequenz des <i>Dshi_0575</i> Promotors.	193
Abb. 78: β -Galaktosidase Aktivität des <i>irpA</i> Promotors.	194
Abb. 79: Sequenz des <i>irpA</i> Promotors.	195
Abb. 80: β -Galaktosidase Aktivität des <i>hemB2</i> Promotors.	197
Abb. 81: Schematischer Aufbau des <i>suf</i> Operons und IscR Promotor Sequenz.	198
Abb. 82: β -Galaktosidase Aktivität des <i>iscR</i> Promotors.	199
Abb. 83: Modell der Regulation des <i>iscR</i> Gens durch die Regulatoren IscR und Irr.	201

Abb. 84: Übersicht der eingefügten Mutationen in den <i>iscR</i> Promotor.	202
Abb. 85: β -Galaktosidase Aktivität des <i>iscR</i> Promotors mit eingefügten Mutationen.	202
Abb. 86: β -Galaktosidase Aktivität verschiedener Promotoren in Abhängigkeit von Hämin.	204
Abb. 87: Modell der Regulation der Gene <i>Dshi_0575</i> , <i>irpA</i> , <i>hemb2</i> und <i>iscR</i> durch die Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR	207
Abb. 88: Vektorkarte des pET-52b(+) Vektors von Novagen.	221
Abb. 89: Vektorkarte des klonierten pET-52b(+) <i>rirA</i> Vektors.	221
Abb. 90: Vektorkarte des klonierten pET-52b(+) <i>iscR</i> Vektors.	222
Abb. 91: Vektorkarte des klonierten suicide Vektors pEX18Tc zur Erstellung einer <i>rirA</i> Deletionsmutante.	222
Abb. 92: Vektorkarte des klonierten suicide Vektors pEX18Tc zur Erstellung einer <i>iscR</i> Deletionsmutante.	223
Abb. 93: Vektorkarte des pBBR1MCS Vektors zur Erstellung von Reportergenfusionen.	223
Abb. 94: Vektorkarte des pBBR10575_480 bp- <i>lacZ</i> Vektors.	224
Abb. 95: Vektorkarte des pBBR1 <i>exbB-lacZ</i> Vektors.	224
Abb. 96: Vektorkarte des pBBR1 <i>irpA-lacZ</i> Vektors.	225
Abb. 97: Vektorkarte des pBBR1 <i>hemb2-lacZ</i> Vektors.	225
Abb. 98: Vektorkarte des pBBR1 <i>iscR-lacZ</i> Vektors.	226

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und technische Anlagen	14
Tabelle 2: Verwendete Kits	16
Tabelle 3: Verwendete Enzyme	16
Tabelle 4: Verwendete Fertiglösungen	17
Tabelle 5: Übersicht über in dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide und Primer	17
Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme dieser Arbeit	20
Tabelle 7: Verwendete Plasmide dieser Arbeit	25
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika	31
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Multiplex Primer für das jeweilige Zielgen	38
Tabelle 10: Übersicht der Ansätze für die T4 Behandlung	40
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Promotoren und der dazugehörigen Primerpaare	46
Tabelle 12: HR-CS AAS Temperatur Programm für Eisen Messungen	64
Tabelle 13: Verwendete Primer für EMSA Experimente	73
Tabelle 14: Anzahl der Eisenmangel induzierten bzw. reprimierten Gene im <i>D. shibae</i> Wildtypstamm.	80
Tabelle 15: Unter Eisenmangel induzierte Gene des <i>D. shibae</i> DFL12 ^T Wildtypstamms aus drei unabhängigen Experimenten mit je 3 Replikaten..	85
Tabelle 16: Mössbauer Parameter gemessen bei 20 K für die nicht produzierenden (A) und die produzierenden (B) <i>E. coli</i> Zellen..	106
Tabelle 17: RirA Regulon..	161
Tabelle 18: IscR Regulon	166
Tabelle 19: Fur Regulon	171
Tabelle 20: Irr Regulon	180
Tabelle 21: Regulation des Gens <i>Dshi_0575</i> durch die Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR.	185
Tabelle 22: Regulation des Gens <i>irpA</i> durch die Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR..	187

Tabelle 23: Regulation des Gens <i>exbB</i> durch die Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR.	188
Tabelle 24: Regulation des Gens <i>fhuA</i> durch die Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR	189
Tabelle 25: Regulation des Gens <i>hemB2</i> durch die Regulatoren Fur, Irr, RirA und IscR	196
Tabelle 26: Übersicht der eingesetzten Mengen an Fe-Ammoniumcitrat und Lithiumsulfid für die Rekonstitution von RirA	227

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben und mich stets unterstützt haben:

Meinem Mentor Prof. Dr. Dieter Jahn, für die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Arbeitskreis anzufertigen, die hervorragende Betreuung und die hilfreichen Diskussionen, die den einen oder anderen Knoten im Kopf gelöst haben.

Prof. Dr. Martin Bröring für die Übernahme des Korreferats und für die stetige Hilfe in allen chemischen Fragen.

PD Dr. Simone Bergmann für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Elisabeth Härtig für ihre stets optimistische Einstellung, für die tolle Betreuung und Hilfe während der Anfertigung dieser Arbeit und für die Vergabe des spannenden Themas sowie die tolle Arbeitsatmosphäre.

Anja Hartmann für ihre stetige Hilfsbereitschaft bei allen anfallenden Problemen des Laboralltags.

Miriam Becker, Matthias Ebert und Lisa Plötzky für die tolle Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe.

Meine zahlreichen Bachelor- und Masterstudenten Alina Rommerskirch, Sarah Meyer, Collin Starke, Kim Rennhack, Marcel Schleuning und Denise Kleiner für die tolle Arbeit im Labor.

Jenny Jacobs für die Bereitstellung ihrer Rohdaten für die Regulon Definitionen.

und der gesamten Arbeitsgruppe Jahn und dem Institut für Mikrobiologie für die interessanten Themen beim Mittagessen, dem angenehmen Arbeitsklima und der Hilfsbereitschaft.

Der AG Ott für die Durchführung der AAS Bestimmung.

Dr. Dirk Baabe, Dr. Peter Schweyen und Marc-Kevin Zaretske aus dem Institut für anorganische und analytische Chemie der TU-Braunschweig für ihre Hilfe bei den ESR- und Mössbauerexperimenten.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, besonders bei meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung und den Rückhalt sowie bei Marco, der stets mein Fels in der Brandung war, wenn es mal wieder etwas stürmischer wurde.

Maren Behringer

Robert-Koch-Straße 6,
38106 Braunschweig
Deutschland
Telefon: 0170-5828549
E-Mail: maren.behringer@t-online.de



PERSÖNLICHE DATEN

-
- Geburtsort: Neustadt am Rbge
 - Geburtstag: 5. Januar 1990
 - Nationalität: deutsch
 - Familienstand: ledig

AUSBILDUNG

-
- | | |
|-------------------|---|
| 10/2014 - 12/2018 | Promotion
Technischen Hochschule Carolo-Wilhelmina, Braunschweig
Institut für Mikrobiologie, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jahn
Titel: Genregulatorische Netzwerke für die Adaptation von <i>Dinoroseobacter shibae</i> an Eisenmangel |
| 10/2012 - 09/2014 | Studiengang Master Biologie
Technischen Hochschule Carolo-Wilhelmina, Braunschweig
Schwerpunkt: Mikrobiologie und Biochemie/Bioinformatik
Masterarbeit
Institut für Mikrobiologie, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jahn
Titel: Die heterologe Produktion und Reinigung des anaeroben Regulators Fnr aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i> und Versuche zur Kristallisation.
Abschluss: Master of Science Biologie, Note:1,6 |
| 10/2009 - 09/2012 | Studiengang Bachelor Biologie
Technischen Hochschule Carolo-Wilhelmina, Braunschweig
Bachelorarbeit
Institut für Mikrobiologie, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jahn
Titel: Die heterologe Produktion und Reinigung der DNA Bindedomäne des Regulators AlsR aus <i>Bacillus subtilis</i> und Versuche zur Kristallisation.
Abschluss: Bachelor of Science Biologie, Note:2,2 |

VERÖFFENTLICHUNGEN

Functional definition of the two effector binding sites, the oligomerization and DNA binding domains of the *Bacillus subtilis* LysR-type transcriptional regulator AlsR.
Härtig E, Frädrich C, Behringer M, Hartmann A, Neumann-Schaal M, Jahn D.
Mol Microbiol. 2018 Jul 24. doi: 10.1111/mmi.1408
